مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره اول (پیاپی ۲۶) بهار ۱۳۹۵
صفحات ۴۳-۳۴

Original Article

ارزیابی فراوانی ژن های مقاومت به متی سیلین (*mecA*) و پنتون ولنتین لوکوسیدین (*pvl*) در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های بالینی بیمارستان های شهر رشت

مریم رحیم پور حصاری[۱]، امیر میرزایی[۲]، علی صالح زاده[*۳]

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، [۲] مربی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، [۳] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت.

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم ترین عوامل عفونت بیمارستانی است و امروزه سویه های مقاوم به متی سیلین شیوع زیادی پیدا کرده اند. هم چنین، توکسین پنتون ولنتین لکوسیدین یکی از عوامل مهم بیماری زا در *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد. این مطالعه با هدف بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی، حضور ژن های مقاومت به متی سیلین و پنتون ولنتین لوکوسیدین در میان سویه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بیمارستان های شهر رشت انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۲۵۰ نمونه بالینی جمع آوری شده از بیمارستان های مختلف شهر رشت در یک سال (۱۳۹۳-۱۳۹۲) انجام شد. در ابتدا جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط آزمون های میکروبی شناسایی شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها بر اساس روش استاندارد CLSI تعیین گردید. همچنین، برای ردیابی وجود ژن های مقاومت به متی سیلین (*mecA*) و پنتون والنتین لوکوسیدین (*pvl*) از واکنش زنجیره ای پلی مراز استفاده شد.

یافته ها: از میان ۲۵۰ نمونه مورد بررسی، ۵۰ جدایه متعلق به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. آزمایش حساسیت میکروبی نشان داد که ۳٤ سویه (٦٨ درصد) از جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین بودند. هم چنین فراوانی ژن های *mecA* و *pvl* در بین جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ٦٠ درصد (۳۰ نمونه) و ۲۰ درصد (۱۰ نمونه) بود.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش افزایش مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف را نشان داد. این امر می تواند یک هشدار جدی برای درمان عفونت های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در منطقه مورد بررسی باشد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن *mecA*، ژن *pvl*

دریافت مقاله: آبان ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹٤

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) یک باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری است که به عنوان یک باکتری بیماری زای شایع در موارد بیمارستانی شناخته می شود. مطالعات نشان می دهد که *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۲۰ درصد از افراد می تواند به صورت پایدار وجود داشته باشد. این در حالی است که ٦٠ درصد از افراد نیز ناقل متناوب این باکتری در نظر گرفته می شوند. این باکتری موجب طیف گسترده ای از بیماری ها شامل اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندروم شوک توکسیک، کورک یا دمل می شود. مهم ترین راه انتقال این باکتری به ویژه در مراکز درمانی، دست های آلوده می باشد (۱).

مقاومت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. زیرا این باکتری‌ها بیشتر از سایر باکتری‌های دیگر مقاومت دارویی نشان

*) آدرس برای مکاتبه: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲٦۹۳۲۱۹٦ پست الکترونیک: salehzadehmb@yahoo.com

می‌دهند. هم چنین، بر اساس منطقه جغرافیایی دستخوش تغییرات قابل توجهی در الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در طول سالیان گذشته شده است. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت های ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مانند بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و غیره می باشد. این امر موجب گسترش عفونت های ناشی از این باکتری و همچنین بروز مشکلاتی مانند افزایش میزان مرگ و میر، افزایش میزان جراحات وارده به بیماران بستری شده، افزایش هزینه های درمان از طریق نیاز به آنتی بیوتیک های گران قیمت، افزایش مدت زمان بستری بیماران در بیمارستان ها گردیده است. این مساله پزشکان را جهت درمان عفونت های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* با محدودیت های بسیاری مواجه نموده است (۲).

مطالعات نشان داده است که بیش از ۳۰ تا ۵۰ درصد از *استافیلوکوکوس اورئوس* ها به متی سیلین مقاوم شده اند. دلیل این مساله، انتقال ژن *mecA* توسط این سویه ها است. این ژن پروتئین متصل شونده به پنی سیلین با نام PBP2a را کد می کند که میل پیوندی پایینی برای اتصال به آنتی بیوتیک های خانواده بتا لاکتام ها دارند. پروتئین تولیدی توسط این باکتری با وجود حضور آنتی بیوتیک می تواند ساخت دیواره سلولی ادامه یابد و به این شکل در برابر آنتی بیوتیک ها مقاوم می شود (۳).

نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف نشان دهنده افزایش انواع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* یا MRSA) می باشد (٤ و ٥). بیماری زایی عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به ترکیبات متنوع سطح باکتری و پروتئین های خارج سلولی مانند لکوسیدین پنتون ولنتین می باشد (٦). لکوسیدین پنتون ولنتین (*pvl* یا Panton-Valentine leucocidin) یکی از مهم ترین عوامل بیماری زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۷ و ۸). لکوسیدین پنتون ولنتین یک گاما توکسین شامل دو جزء پروتئینی S (۳۸ کیلودالتون) و F (۳۲ کیلودالتون) است که تحت کنترل ژن های *luks/PV* و *lukf/PV* می باشد (۹).

این توکسین توسط یک باکتریوفاژ حمل می شود و قابل انتقال به سایر استافیلوکوک ها می باشد. این توکسین علیه غشای خارجی سلول های پلی مورفونوکلئار، مونوسیت ها و ماکروفاژهای انسانی عمل می کند و بسته به غلظت توکسین، باعث باز شدن کانال های کلسیم و نکروز و آپوپتوزیس لکوسیت های انسانی می شود (۱۰ و ۱۱).

ژن های *luks/PV* و *lukf/PV* می توانند توسط سویه های مقاوم به متی سیلین (MRSA) و حساس به متی سیلین (MSSA) حمل شوند (۱۲). سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* *pvl* مثبت دارای قدرت بیماری زایی بالایی هستند و بیشتر با فورانکل، آبسه های پوستی و عفونت های نکروتیک شدید همراه می باشند (۱۳).

سنتوسانینگ سی (Santosaningsih) و همکاران در سال ۲۰۱٤ اپیدمیولوژی و حمل ژن *pvl* توسط جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* را در بیمارستان های جاوه و بالی اندونزی مورد بررسی قرار دادند (١٤). ۱۵ درصد بیماران مبتلا به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. نرخ حمل *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) ٤/۳ درصد بود. در حالی که ۱/۵ درصد از بیماران مبتلا به *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی سیلین، *pvl* مثبت بودند.

چنگ (Cheng) و همکاران در سال ۲۰۱٤ حضور ژن *pvl* را در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از عفونت پوست بررسی کردند. در این مطالعه، در مجموع ۲۵۹ نمونه HA-MRSA از بیماران بستری در چین جداسازی شد. نتایج نشان داد که ۲۸/٦ درصد از نمونه ها (۷٤ عدد) حامل ژن *pvl* بودند (۱۵).

مقدم (Moghadam) و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین حامل ژن *pvl* را در عفونت های شهر اصفهان مورد بررسی قرار دادند. در مجموع، ٥٦ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از

بیمارستان های اصفهان به دست آمد. از این میان ۱٤/۳ درصد از نظر ژن *pvl* مثبت بودند (۱٦). معتمدی (Motamedi) و همکاران در سال ۲۰۱٤ حضور همزمان ژن های *pvl* و *mecA* را در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی در اهواز مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که به ترتیب ۳۰ و ٦ درصد از نمونه ها ژن *mecA* و ژن *pvl* را دارا بودند. همچنین هیچ یک از نمونه ها به طور هم زمان حامل هر دو ژن *mecA* و ژن *pvl* نبودند. ارتباط معنا داری بین حضور ژن های *pvl* و *mecA* در این نمونه ها وجود نداشت (۱۷ و ۱۸).

هدف از این مطالعه ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی، بررسی حضور ژن *mecA* برای تائید سویه ها ی MRSA و نیز بررسی میزان فراوانی ژن *pvl* در بین سویه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری سویه ها و شناسایی میکروبی سویه ها: در این مطالعه توصیفی، طی یک سال (۱۳۹۳-۱۳۹۲) با تاییدیه کمیته اخلاق پژوهش و رضایتنامه کتبی از بیماران، تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی مختلف (زخم، پوست، خون و ادرار) از مراکز تشخیصی درمانی مختلف (بیمارستان رازی، پورسینا، آزمایشگاه آشتیانی، آزمایشگاه بیمارستان قائم) شهر رشت جمع آوری گردید. شناسایی فنوتیپی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به وسیله رنگ آمیزی گرم و آزمون های کاتالاز، کوآگولاز، DNase، کشت روی محیط برد پارکر آگار و مانیتول سالت آگار (مرک، آلمان) صورت گرفت (۱۹). نمونه های تائید شده تا انجام آزمون های بعدی در محیط کشت اسلنت BHI (مرک، آلمان) حاوی نوترینت گلیسیرین ۱۸ درصد و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

ب) ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ها: انجام آزمایش حساسیت میکروبی (آنتی بیوگرام) با استفاده از روش Kirbey Bauer و طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CSLI) (Clinical and laboratory standards institute) انجام شد (۲۰). حساسیت جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به دیسک های آنتی بیوتیکی سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ واحد)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تری متوپریم (۲۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۵ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و کلیندامایسین (۲ میکروگرم) (MAST, UK) در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) بررسی گردید. به منظور تشخیص مقاومت به متی سیلین (MRSA)، از دیسک آنتی بیوتیکی سفوکسیتین استفاده شد.

در این مطالعه از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت مقاوم به متی سیلین (حاوی ژن *mecA*) و از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 49775 به عنوان کنترل مثبت حاوی ژن *pvl* و از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

ج) استخراج DNA: برای این منظور از روش فنل- کلروفرم استفاده شد. به طور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت باکتری ها به ترتیب ٦۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (Tris-Hcl, pH7.4; EDTA 50mM، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS 25%)، ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) اضافه گردید و در دمای ٦۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت قرار داده شد. به دنبال آن ٦۰۰ میکرولیتر محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲٤:۲۵) اضافه گردید تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت تشکیل شود. سپس در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی (فاز آبی) به لوله های جدید منتقل گردید. این مرحله دوبار تکرار شد. به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم

(1M) اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از انجام سانتریفیوژ (۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور) رسوب حاصل (DNA) خشک و در بافر حل گردید. در نهایت برای تائید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد استفاده شد (۲۱).

د) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ژن *mecA* از پرایمرهای اختصاصی با توالی *mecA*-F: 5' TCCAGATTACAACTTCACCAGG 3' و *mecA*-R: 5' CCACTTCATATCTTGTAACG 3' استفاده گردید (۲۲).

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸/٤ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (25mM)، ۱ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (10p mol)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی مراز (5U/µl) و ۱ میکرولیتر DNA الگو انجام شد.

واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

به منظور تکثیر ژن *pvl* از پرایمرهای اختصاصی با توالی LukS-pvF- 5'AGAAGATACAAGTAGCGATAAGTG 3' و LukS-pvR 5'AAGGATTGAAACCACTGTGTAC 3' استفاده گردید (۲۲). واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. برای مشاهده طول محصولات مورد نظر از روش الکتروفورز و ژل آگاروز ۱ درصد استفاده گردید.

ه) تجزیه و تحلیل آماری: برای این منظور از نرم افزار آماری *SPSS* و آزمون مربع کای استفاده شد. مرز معناداری بر روی P<۰/۰۵ قرار گرفت.

یافته ها

الف) جدا سازی و تشخیص سویه ها از نمونه های بالینی: در این مطالعه در مجموع ۲۵۰ نمونه ادرار، خون، پوست و زخم از آزمایشگاه ها و بیمارستان های شهر رشت جمع آوری شد. فراوانی نمونه ها بر حسب نوع نمونه و جنس در جدول ۱ آمده است. با استفاده از آزمون های میکروبی رنگ آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت آگار، محیط بردپارکر، آزمون کاتالاز و

جدول ۱: فراوانی نمونه های بالینی بر حسب نوع نمونه و جنسیت.

جنسیت / نوع نمونه	زن		مرد		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
خون	۱۵	٦	۲۰	۸	۳۵	۱٤
زخم	۳۲	۱۲/۸	۱۰	٤	٤۲	۱٦/۸
پوست	۲۸	۱۱/۲	۱۵	٦	٤۳	۱۷/۲
ادرار	٦۰	۵۰	۷۰	۲۸	۱۳۰	۵۲

جدول ۲: میزان مقاومت و حساسیت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف.

آنتی بیوتیک	سویه های مقاوم		سویه های نیمه حساس		سویه های حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سفوکسیتین	۳٤	٪٦۸	۰	٪۰	۱٦	٪۳۲
ونکومایسین	۰	٪۰	۰	٪۰	۵۰	٪۱۰۰
سیپروفلوکساسین	۲۱	٪٤۲	۱	٪۲	۲۸	٪۵٦
پنی سیلین	٤۹	٪۹۸	۰	٪۰	۱	٪۲
اریترومایسین	۲۸	٪۵٦	۹	٪۱۸	۱۳	٪۲٦
تری متوپریم	٤۳	٪۸٦	۳	٪٦	٤	٪۸
آمیکاسین	۲۱	٪٤۲	۳	٪٦	۲٦	٪۵۲
آمپی سیلین	٤۵	٪۹۰	۰	٪۰	۵	٪۱۰
جنتامایسین	۲۰	٪٤۰	۳	٪٦	۲۷	٪۵٤
آموکسی سیلین	٤۳	٪۸٦	۰	٪۰	۷	٪۱٤
کلرامفنیکول	٤	٪۸	۷	٪۱٤	۳۹	٪۷۸
کلیندامایسین	۲۳	٪٤٦	٦	٪۱۲	۲۱	٪٤۲

کواگولاز، تعداد ۵۰ نمونه آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند.

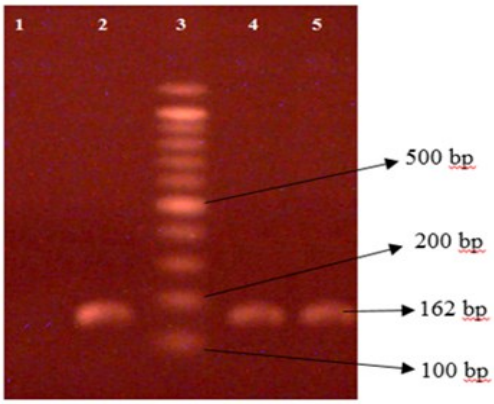
ب) ارزیابی حساسیت میکروبی: نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که ۳٤ جدایه از ۵۰ جدایه مورد بررسی (٦٨٪) نسبت به آنتی بیوتیک سفوکسیتین مقاوم بودند و به عنوان سویه های MRSA در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۹۸ درصد)، آمپی سیلین (۹۰ درصد)، آموکسی سیلین و تری متوپریم (۸٦ درصد)، سفوکسیتین (٦٨ درصد) مشاهده شد. بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های ونکومایسین (۱۰۰ درصد) و سیپروفلاکساسین (٥٦ درصد) گزارش گردید. در مجموع میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جداسازی شده از نمونه های ادرار و زخم بیشتر از سایر سویه ها بود. همچنین مقاومت نسبت به ونکومایسین در هیچ یک از سویه ها مشاهده نشده بود (جدول ۲).

ج) نتایج تکثیر ژن mecA در این مطالعه با توجه به طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA* انتظار باند ۱٦۲ جفت باز داشتیم (شکل ۱). نتایج نشان داد که توزیع ژن *mecA* در نمونه های *استافیلوکوکی* در ٦۰ درصد نمونه ها (۳۰ نمونه) وجود داشت. لازم به ذکر است میزان شیوع ژن *mecA* در نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های زخم بیشتر از سایر نمونه ها بود. به طوری که از مجموع ۳۰ نمونه، تعداد ۱۵ نمونه متعلق به نمونه های زخم بودند (P<۰/۰۳۲).

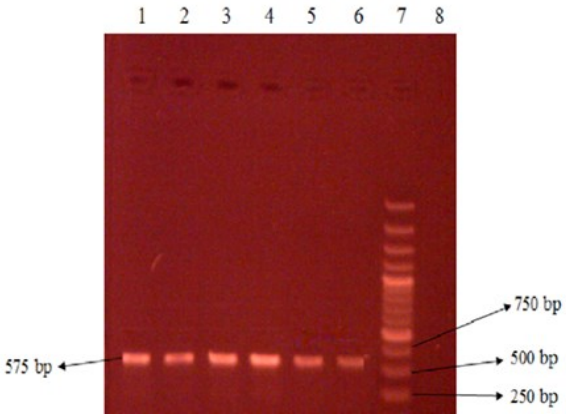
د) نتایج تکثیر ژن pvl: به منظور بررسی وجود ژن پنتون والنتین لکوسیدین (*pvl*) در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و نتایج با ارزیابی باند ۵۷۵ bp بررسی شد (شکل ۲). ژن *pvl* در ۲۰ درصد از نمونه ها (۱۰ نمونه) مشاهده گردید. ارتباط معناداری بین وجود ژن *pvl* و نوع نمونه (P<۰/۰٤٦) و ژن *mecA* در بین سویه ها وجود داشت (P<۰/۰۱۵).

بحث

امروزه مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشکلات فراوانی را در درمان بیماری های ناشی از این ارگانیسم در نقاط مختلف جهان ایجاد کرده است. متاسفانه اطلاعات کمی در مورد میزان مقاومت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی بیوتیک های مختلف در برخی از شهرهای ایران وجود دارد. نتایج بیان گر این مطلب است که فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) بیشتر به بخش های عفونی، جراحی مربوط می شود. خطر بالقوه



شکل ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *mecA* ستون ۱) کنترل منفی، ستون های ۲ و ٤) نمونه های حاوی ژن *mecA* (۱٦۲ جفت باز)، ستون ۳) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۵) کنترل مثبت.



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *pvl* ستون های ۱ تا ۵) نمونه های حاوی ژن *pvl* (۵۷۵ جفت باز)، ستون ٦) کنترل مثبت، ستون ۷) مارکر (1kb)، ستون ۸) کنترل منفی.

انتشار سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) در بخش مراقبت های ویژه به دلیل مشکلات بیشتر بیماران، دستکاری های متعدد پزشکی و مصرف وسیع آنتی بیوتیک ها همیشه مورد توجه بوده است.

مطالعه زمانی (Zamani) و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ۷۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که ۵۰ درصد نمونه ها نسبت به سفوکسیتین مقاوم بوده اند (MRSA). همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی در میان سویه های مقاوم به متی سیلین نسبت به آنتی بیوتیک هایی مانند پنی سیلین (۱۰۰ درصد)، تتراسایکلین (۷٤/۲ درصد)، کوتریموکسازول (٦٨/٥ درصد)، اریترومایسین (٦٨/٥ درصد) و سفتازیدیم (٥١/٤ درصد) مشاهده گردید (۲۲). مطالعه مرادی (Moradi) و همکاران در سال ۱۳۹۰ بر روی ۱۰٤ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین میزان حساسیت نسبت به ونکومایسین (۹٦/۲ درصد)، کلرامفنیکل (۸۸/۲ درصد)، ریفامپین (۸۱/۷ درصد) بوده است. میزان مقاومت سویه ها نسبت به سفوکسیتین معادل ٤۰/٤ درصد گزارش شد (۲۳). حق گو (Haghgo) و همکاران در سال ۲۰۱۲ تعداد ۱۳ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* را از کشت خون بیماران بستری در بیمارستان شهید مدنی تبریز جداسازی نمودند. نتایج آنها نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به متی سیلین و سفتریاکسون (۳۱ درصد) بوده است (۲٤). در مطالعه حاضر ٦٨ درصد از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بیماران، مقاوم به سفوکسیتین (MRSA) بودند. این یافته بیشتر از فراوانی به دست آمده در سایر مطالعات می باشد.

پنتون والنتین لوکوسیدین (*pvl*) فاکتور بیماری زایی است که توسط یک باکتریوفاژ حمل می شود و قابلیت انتقال به سایر استافیلوکوک ها را دارا می باشد. سویه های *pvl* مثبت قدرت بیماری زایی بالایی دارند و مسئول عفونت های شدیدی مانند عفونت مغزاستخوان، مفصل و پنومونی نکروز دهنده هستند. بنابراین تشخیص سریع و کنترل به موقع سویه های مولد ژن *pvl* امری ضروری به شمار می آید. این مطالعه اولین بررسی صورت گرفته برای تعیین فراوانی ژن *pvl* در نمونه های بالینی شهر رشت است. در مطالعه حاضر مشخص شد که از ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* تعداد ۱۰ جدایه (۲۰٪) حامل این ژن بودند. همچنین ارتباط معنا داری بین حضور ژن *mecA* و ژن *pvl* در بین سویه ها مشاهده نگردید.

ملاعباس زاده (Molla-abbaszadeh) و همکاران شیوع ژن *pvl* را در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ارزیابی نمودند. از مجموع ۱۰۰ سویه مورد بررسی، ۱۸ سویه (۱۸ درصد) از نظر وجود ژن *pvl* مثبت گزارش شد. از این میان ۹٤/٤ درصد MRSA و ٥٦/٦ درصد حساس به متی سیلین (MSSA) بودند (۲٥). در مطالعه خسروی (Khosravi) و همکاران شیوع ژن *pvl* در جدایه های MRSA برابر با ۷/۲ درصد و در جدایه های MSSA برابر با ۳۳/۳ درصد گزارش شد (۲٦). در سال های اخیر بیشتر مطالعات بر روی سویه های PVL مثبت MRSA متمرکز شده است. در صورتی که عفونت های PVL مثبت MSSA نیز نقش مهمی در انتشار سویه های PVL مثبت ایفا می نمایند. حدود ٦۰ درصد کل سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* PVL مثبت در انگلستان در پنج سال گذشته حساس به متی سیلین بوده اند (۲۷).

مطالعه کوپانه (Cupane) و همکاران نشان داد که ۷٥ درصد جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ژن *pvl* بودند. به طوری که بیشتر آن ها (٦۰/۷ درصد) MRSA بودند (۱۰). عثمان (Osman) و همکاران میزان شیوع ژن *pvl* را در میان جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سودان بررسی نمودند. از میان ۲۱۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده، ژن *pvl* در ۱۲۲ نمونه (٥۸ درصد) مشاهده شد (۲۸).

در مطالعه حاضر شیوع ژن *pvl* در سویه های MRSA بیشتر بود. به طوری که ٦۰ درصد نمونه های *pvl* مثبت (٦ نمونه) در سویه های MRSA و ٤۰ درصد آن (٤ نمونه) در سویه های MSSA وجود داشت. هم چنین شیوع ژن *pvl* نسبت به مطالعه ملاعباس زاده (Molla-abbaszadeh) و خسروی (Khosravi) بیشتر و نسبت به مطالعه کوپانه (Cupane) و عثمان (Osman) کمتر بود. اما مانند تمامی مطالعات یاد شده شیوع ژن *pvl* در جدایه های MRSA بیشتر بود.

عفونت با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار شایع است و توکسین های تولید شده توسط این باکتری مشکلات و معظلات فراوانی را در سطح جامعه به وجود آورده است. همچنین به دلیل بروز مقاومت های آنتی بیوتیک، درمان آن نیز یکی از مشکلات بهداشتی می باشد. بنابراین ضرورت استفاده از روش های تشخیصی مناسب برای شناسایی صحیح عامل عفونت وجود دارد. این امر به تشخیص سریع و کنترل به موقع سویه های مولد ژن *pvl* و سایر توکسین ها کمک خواهد نمود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده افزایش مقاومت نمونه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف در منطقه مورد پژوهش است. در این مطالعه مشخص گردید که میزان مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به سفوکسیتین در این منطقه بسیار بالا است و از طرف دیگر مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و کینولون ها در حال افزایش است. هم چنین نتایج نشان داد که ژن *pvl*، در منطقه مورد مطالعه فراوانی بیشتری نسبت به سایر نقاط جهان دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی همکاران دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Malekzade F. Microbiology. 5th ed., University of Tehran press. 2010.

2. Tarai B, Das P, Kumar D. Recurrent challenges for clinicians: emergence of methicillin resistant, vancomycin resistance, and current treatment options. J Lab Physicians. 2013; 5(2): 71-78.

3. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. Clin Infect Dis. 2007; 45 (Supplement 3): S171-S176.

4. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009; 7(9): 629-641.

5. Lindsay JA. Evolution of *Staphylococcus aureus* and MRSA during outbreaks. Infect Genet Evol. 2014; 21: 548-553.

6. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999; 29(5): 1128-1132.

7. Supersac G, Prevost G, Piemont Y. Sequencing of leucocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that *Staphylococcal leucocidins* and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. Infect Immun. 1993; 61(2): 580-587.

8. Clark J. A brief review of Panton-Valentine leukocidin producing staphylococcal infections in the intensive therapy unit. Curr Anaesthesia and Crit Care. 2002; 19(5): 330-332.

9. Colin DA, Mazurier I, Sire S, Finck-Barbancon V. Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes:

sequential binding and subsequent activation. Infect Immun. 1994; 62(8): 3184-3188.

10. Cupane L, Pugacova N, Berzina D, Cauce V, Gardovska D, Miklasevics E. Patients with Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation. Int J Mol Epidemiol Genet. 2012; 3(1): 48-55.

11. Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community acquired MRSA strains in Ireland. J Clin Microbiol. 2007; 45(8): 2554-2563.

12. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leucocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. 2003; 9(8): 978-984.

13. Brown ML, O'Hara FP, Close NM, Mera RM, Miller LA, Suaya JA. Prevalence and sequence variation of panton-valentine leukocidin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *staphylococcus aureus* strains in the United States. J Clin Microbiol. 2012; 50(1): 86-90.

14. Santosaningsih D, Santoso S, Budayanti NS, Kuntaman K, Lestari ES, Farida H, Hapsari R, Hadi P, Winarto W, Milheiriço C, Maquelin K, Willemse-Erix D, van Belkum A, Severin JA, Verbrugh HA. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* harboring the *mecA* or Panton-Valentine leukocidin genes in hospitals in Java and Bali, Indonesia. Am Soc of Trop Med Hyg. 2014; 3(4): 728-734.

15. Hu Q, Cheng H, Yuan W, Zeng F, Shang W, Tang D, Xue W, Fu J, Zhou R, Zhu J, Yang J, Hu Z, Yuan J, Zhang X, Rao Q, Li S, Chen Z, Hu X, Wu X, Rao X. Panton-Valentine Leukocidin (PVL)-positive health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates are associated with skin and soft tissue infections and colonized mainly by infective PVL-encoding bacteriophages. J Clin Microbiol. 2015; 53(1): 67-72

16. Moghadam SO, Havaei SA. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying panton-valentine leukocidin gene in cutaneous infections in the city of Isfahan. J Med Bacteriol. 2012; 19(2): 9-16.

17. Motamedi H, Rahmat Abadi SS. The Association of panton-valentine leukocidin and *mecA* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients referred to educational hospitals in Ahvaz, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(8): e22021.

18. Lu SY, Chang FY, Cheng CC, Lee KD, Huang YC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among adult patients visiting emergency department in a medical center in Taiwan. PLoS ONE. 2011; 6(6): e18620.

19. Shakeri F, Golalipour M, Rahimi Alang S, Ghaemi EA. Spa diversity among MRSA and MSSA strains of *Staphylococcus aureus* in north of Iran. Int J Microbiol. 2010; (2): 351397

20. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, van Belkum A, Neela V. A simplified

multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome mec types in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Med Microbiol. 2010; 59(10): 1135-1139.

21. Ohadian Moghadam S, Havaei SA, Pourmand MR. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying panton– valentine leukocidin gene in cutaneous infections in the city of Isfahan. J Med Bacteriol. 2012; 1(2): 9-16.

22. Zamani A, Sadeghian S, Ghaderkhani J, Alikhani MY, Najafimosleh M, Taghi Goodarzi M. Detection of methicillin-resistance (mec-A) gene in *Staphylococcus aureus* strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. Ann Microbiol. 2007; 57(2): 273-276.

23. Moradi N, Javadpour S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of *staphylococcus aureus* to vancomycin. Hormozgan Uni Med Sciences. 2011; 15(3): 169-177.

24. Haghgoo S, Moaddab S, Rafi A. Study of antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood cultures in Tabriz Shahid Madani Hospital. J Jundishapur. 2012; 3(2): 383-390.

25. Molla-abbaszadeh H, Mobayen H, Mirzaei H. Identification of pantonvalentine leukocidin (pvl) genes in *Staphylococcus aureus* isolated from ipatients of Emam Reza and Shohada Hospitals of Tabriz by real-time PCR. Iran J Med Microbiol. 2013; 6(4): 72-80.

26. Khosravi AD, Hoveizavi H, Farshadzadeh Z. The prevalence of genes encoding leukocidins in *Staphylococcus aureus* strains resistant and sensitive to methicillin isolated from burn patients in Taleghani Hospital, Ahvaz, Iran. Burns. 2012; 38(2): 247-251.

27. Otokunefor K, Sloan T, Kearns AM, James R. Molecular characterization and panton-valentine leucocidin typing of community-acquired methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2012; 50(9): 3069-72.

28. Osman NAM, Intisar IE, Mohamed YM, El-Eragi AM, Eldirdery MM, Salih MA. Molecular study of panton-valentine leukocidin genes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Khartoum State, Sudan. Am J Microbiol Res. 2015; 3(3): 107-111.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 1, April 2016

Original Article

Frequency of methicillin resistant (*mecA*) and panton-valentine leucocidin (*pvl*) genes among *Staphylococcus aureus* isolates recovered from clinical samples of Rasht hospitals

Maryam Rahimi Hesari[1], Amir Mirzaie[2], Ali Salehzadeh[3]

[1]MS.c., Department of Biology, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
[2]BS.c., Young Researchers and Elite Club, East Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Biology, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Staphylococcus aureus* is one of the most important nosocomial infection agent and now methicillin-resistant *S. aureus* have spread. Also, panton-valentin leukocidin is one of important virulence factors in *S. aureus*. The study was aimed to evaluate the antibiotic resistant, frequency methicillin resistant and panton- valentin leukocidin genes in clinical *S. aureus* isolates from hospitals of Rasht, Iran.

Materials & Methods: This cross-sectional study was carried out on 250 clinical samples collected from hospitals of Rasht during one year (2013-2014). The *S. aureus* isolates were identified by microbiological methods. Antibiotic sensitivity was performed by CSLI method using disk diffusion method. In addition, the presence of methicillin resistant (*mecA*) and panton-valentin leukocidin (*pvl*) genes were evaluated using polymerase chain reaction (PCR).

Results: Totally, 50 *S. aureus* isolates were recovered. The results of antibiotic susceptibility tests showed that 34 out of 50 *S. aureus* isolates (68%) were resistant to methicillin. In addition, the prevalence of *mecA* and *pvl* gene among isolates were 60% (30 isolates) and 20% (10 isolates), respectively.

Conclusion: This study showed increased resistance to different antibiotics in *S. aureus* that is a serious warning to the treatment of infections caused by this bacterium in the region

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *pvl* gene, *mecA* gene.

Correspondence to: Ali Salehzadeh

Tel: +989126932196

E-mail: salehzadehmb@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 9(1): 34-43.