www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 60, No. 4 P: 586-596
Sep-Oct 2017

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۰، شماره ۴
مهر – آبان ۹۶، صفحه ۵۹۶-۵۸۶

مقاله اصلی

بررسی توزیع فراوانی ژن tst و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده از عفونت‌های دستگاه تنفسی در اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۰۱- تاریخ پذیرش:۹۶/۰۷/۰۵

سارا گرجی[۱]
زهرا بم زاده[۲*]
حسن ممتاز[۳]

۱- کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲-استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳- استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

* گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
تلفن: ۰۹۱۳۶۰۶۵۶۷۲
Email: bamzadehz@yahoo.com

خلاصه

مقدمه

یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان، عفونت دستگاه تنفسی است که در اثر حمله باکتری‌هایی مانند استافیلوکوکوس‌اورئوس به دستگاه تنفس فوقانی ایجاد می‌گردد. با توجه به تنوع ژنومی گونه‌ها و توکسین‌های سویه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری، تشخیص سریع باکتری به منظور کاهش انتقال و شیوع این پاتوژن در عفونت‌های بیمارستانی امری ضروری است. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی ژن tst و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس در عفونت دستگاه تنفسی می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه که در پاییز-زمستان۱۳۹۴در بیمارستان های اصفهان انجام شد،۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس‌اورئوس از بیماران مبتلا به عفونت‌های تنفسی انتخاب و ژن tst با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و پرایمرهای اختصاصی در این جدایه‌ها تکثیر و از طریق ژل الکتروفورز بررسی گردید. بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها با روش انتشار دیسک در مقابل ۱۲ آنتی‌بیوتیک انجام گردید.

نتایج

در ۱۴ مورد از ۱۰۰ جدایه بررسی شده، ژن tst شناسایی شد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این سویه‌ها مربوط به اگزاسیلین (٪۱۰۰) و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به وانکومایسین (۱۴/۳ ٪) بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به تولید توکسین‌های مختلف در سویه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس و نیز با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری، تشخیص زود هنگام و درمان مناسب برای جلوگیری از پیشرفت بیماری ناشی از این باکتری امری ضروری است.

کلمات کلیدی

استافیلوکوکوس‌اورئوس، ژن tst، عفونت‌های دستگاه تنفسی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

استافیلوکوکوس‌اورئوس میکروارگانیسمی است که موجب ایجاد طیف وسیع و متنوعی از بیماری‌ها مانند اندوکاردیت، باکتریمی، استئومیلیت، مسمومیت غذایی، سپتی‌سمی، عفونت-های پوستی، عفونت‌های زخم، عفونت‌های بافت نرم، عفونت پس از جراحی و گاهی مرگ و میر در انسان می‌گردد (۲-۱).

استافیلوکوکوس‌اورئوس یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی است که در خلال چندین دهه گذشته از جمله عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های کسب شده در سطح جامعه و بیمارستان بوده است. عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم مکررا در بیماران بستری شده روی می‌دهد که علی رغم درمان آنتی‌بیوتیکی عوارض شدیدی از خود بر جای می‌گذارند. در واقع این باکتری از عوامل بیماریزای اصلی در عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی بوده و تقریبا همه انسان‌ها در طول زندگی خود نوعی از عفونت استافیلوکوکی را تجربه می‌کنند که شدت آن از یک مسمومیت غذایی ساده و یا عفونت پوستی خفیف تا عفونت‌های شدید و کشنده متغیر است و افزایش روزافزون موارد مقاوم، درمان آن را پیچیده ساخته است (۳-۲).

یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس‌اورئوس، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از قبیل بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و ... می‌باشد که این امر موجب گسترش عفونت‌های ناشی از این باکتری و همچنین بروز مشکلاتی از قبیل افزایش میزان مرگ و میر، افزایش میزان جراحات وارده به بیماران بستری شده، افزایش هزینه‌های درمان از طریق نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های گران قیمت، افزایش مدت زمان بستری بیماران در بیمارستان‌ها و افزایش هزینه‌های بیمه-های درمانی گردیده که این مسئله پزشکان را جهت درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس‌اورئوس با محدودیت‌های بسیاری مواجه کرده است. مقاومت این پاتوژن به اغلب داروهای موجود در حال افزایش است (۴).

استافیلوکوکوس‌اورئوس فاکتورهای ویرولانس متعددی دارد که پاتوژنسیته و کلونیزاسیون باکتری را به آن‌ها نسبت می‌دهند. انتروتوکسین‌ها و توکسین سندروم شوک توکسیک (TSST-1) مترشحه از این باکتری از فاکتورهای ویرولانس بسیار مهم و جزء سوپر آنتی‌ژن‌ها می‌باشند که تاثیرات بسیار مهمی بر میزبان خود دارند. بیشتر سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری سندروم شوک سمی، توکسینی تولید می‌کنند که به عنوان TSST-1 شناخته شده است. این بیماری با علائمی از قبیل تب، اسهال، استفراغ، درد عضلانی، راش‌های جلدی مخملکی شکل و در موارد شدید افت فشار خون، لنفادنوپاتی و نارسایی کبدی و کلیوی همراه است. ژن tst که عامل بیماری است، می‌تواند در میان سویه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس در جامعه به راحتی منتقل شود (۷-۵). مطالعه حاضر با هدف ردیابی این ژن در جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس و تعیین ارتباط بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری با حضور این ژن انجام شده است.

روش کار

در این مطالعه توصیفی- مقطعی در مدت ۶ ماه ۱۰۰ نمونه مشکوک به استافیلوکوکوس‌اورئوس از تراشه دستگاه تنفسی در برخی بیمارستان‌های شهر اصفهان جمع‌آوری و جهت جداسازی به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس این جدایه‌های بالینی روی محیط کشت بلاد آگار حاوی خون گوسفندی کشت داده شده و پس از حصول اطمینان از خالص بودن کشت، جهت تشخیص نمونه از رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی استفاده شد. جدایه‌ها جهت مطالعات بعدی در محیط کشت مایع TSB (Merck, Germany) کشت داده شدند.

تایید مولکولی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

DNA ژنومی جدایه های رشد یافته در محیط TSB و استافیلوکوکوس‌اورئوس (PTCC 1189) به عنوان سویه استاندارد با استفاده از کیت استخراج DNA (DNA Genomic Purification, Fermentas, Lithuani) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور تایید قطعی استافیلوکوکوس‌اورئوس در جدایه‌های مورد مطالعه آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ با ردیابی ژن ۱۶srDNA باکتری انجام گرفت (۸).

در این مرحله آزمایش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۲/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۲ میکرولیتر dNTP mix، ۱ میکرولیتر از هر یک از زوج پرایمرهای F و R، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و ۱ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه و ۱۴/۷ میکرولیتر آب مقطر در دستگاه ترمال سیکلر (FlexCycler, Germany) انجام شد.

در این تکنیک برای آغاز فرآیند پلی‌مریزاسیون دستگاه ترمال سیکلر به مدت ۳۶۰ ثانیه بر روی دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد تنظیم گردید و متعاقباً ۳۵ سیکل PCR به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۵ ثانیه اجرا گردید. در نهایت به مدت ۴۸۰ ثانیه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در انتها دمای ۴ درجه سانتی-گراد انتخاب شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن ۱۶srDNA در جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس (۸)

نام ژن	توالی پرایمر (′۳-′۵)	اندازه محصول (جفت باز)
۱۶srDNA	F-GTAGGTGGCAAGCGTTAC R- CGCACATCAGCGTC	۲۲۸

شناسایی ژن tst

جهت شناسایی وجود ژن tst، که رمز کننده توکسین شوک سمی-۱ می‌باشد، از تست PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داده شده در جدول ۲ استفاده شد (۸).

تکثیر ژن tst با مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۱میکرولیتر dNTP mix، ۱ میکرولیتر از هر یک از زوج پرایمرهای F و R، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و ۱ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه و ۱۶/۳ میکرولیتر آب مقطر در دستگاه ترمال سیکلر (FlexCycler, Germany) انجام شد.

در این تکنیک برای آغاز فرآیند پلی‌مریزاسیون دستگاه ترمال سیکلر به مدت ۳۰۰ ثانیه بر روی دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد تنظیم گردید و متعاقباً ۳۵ سیکل PCR به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه اجرا گردید. در نهایت به مدت ۶۰۰ ثانیه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در انتها دمای ۴ درجه سانتی-گراد انتخاب شد.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن tst در جدایه-های استافیلوکوکوس‌اورئوس (۸).

نام ژن	توالی پرایمر (′۳-′۵)	اندازه محصول (جفت باز)
tst	F-ATGGCAGCATCAGCTTGATA R-TTTCCAATAACCACCCGTTT	۳۵۰

الکتروفورز محصول PCR

محصول PCR مربوط به هر مرحله از انجام آزمایش PCR روی ژل ۱ ٪ آگارز الکتروفورز گردید. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدودا ۴۵ دقیقه در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA انجام گرفت و بعد از مشاهده ژل با دستگاه Gel documentation (Uvitec, UK)از ژل حاصله تصویربرداری صورت گرفت.

تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس به روش دیسک ساده (کربی- بائر) و بر اساس استانداردهای CLSI نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول (۲۵µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، کلیندامایسین (۲µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، اگزاسیلین (۱µg)، متی‌سیلین (۵µg)، سفازولین (۳۰µg)، سفالکسین (۳۰µg)، کربنی‌سیلین (۱۰۰µg)، وانکومایسین (۱۰µg) و پنی‌سیلینG (۱۰ واحد)

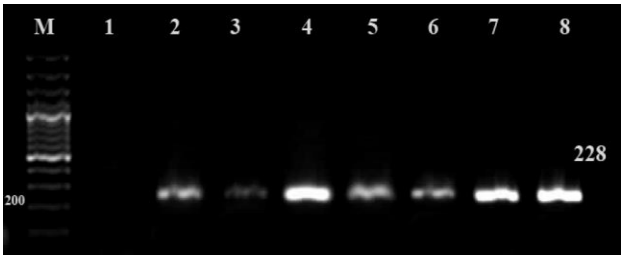
بررسی شد.

برای این منظور از کشت تازه هر جدایه بر روی محیط بلاد آگار، چند کلنی در داخل لوله محتوی ۱ml سرم فیزیولوژی استریل حل گردید و به خوبی ورتکس شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند به دست آمد. سپس سواب استریل به سوسپانسیون باکتری آغشته شد و به صورت متراکم بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های آنتی-بیوتیکی با استفاده از پنس استریل بر روی محیط قرار داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مدت، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری شد (۹).

نتایج

در ۱۰۰ نمونه کشت داده شده، بر پایه نتایج رنگ‌آمیزی گرم و خصوصیات بیوشیمیایی آلودگی با استافیلوکوکوس‌اورئوس یافت شد که هر ۱۰۰ جدایه از نظر مولکولی با ردیابی ژن ۱۶srDNA استافیلوکوکوس‌اورئوس به تایید رسیدند (تصویر ۱).

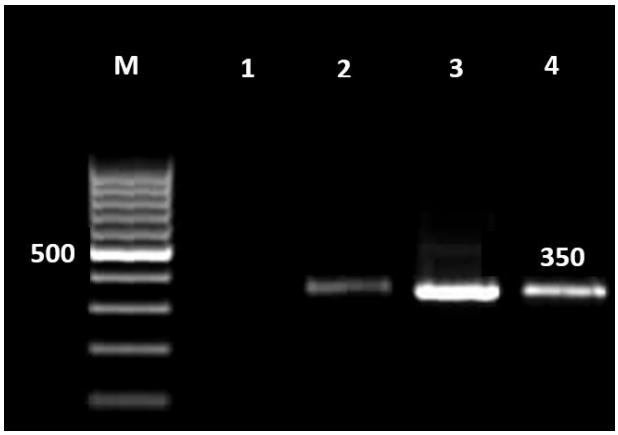
بر پایه سن و جنس افراد مورد مطالعه، ۵۲ ٪ جدایه‌ها متعلق به مردان بوده و ۴۸ ٪ جدایه‌ها نیز از زنان جداسازی شدند. ۴۵ ٪ جدایه‌ها متعلق به رنج سنی بین ۵۰ تا ۷۰ سال بوده و ۵۵ ٪ جدایه ها از بیماران با سن بالای ۷۰ سال جداسازی شدند.



تصویر ۱. تصویر حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن ۱۶srDNA استافیلوکوکوس‌اورئوس روی ژل آگارز ۱٪ (ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۲ تا ۷: نمونه‌های مورد مطالعه، ستون ۸: کنترل مثبت)

شناسایی ژن tst

جهت تشخیص وجود ژن tst رمز کننده توکسین شوک سمی در میان جدایه های استافیلوکوکوس‌اورئوس از آزمون PCR استفاده گردید. نتایج حاصل از این آزمون در تصویر ۲ نشان داده شده است. این ژن تنها در ۱۴ جدایه (۱۴ ٪) استافیلوکوکوس‌اورئوس مشاهده گردید.



تصویر ۲. تصویر حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن tst در جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس روی ژل آگارز ۱٪ (ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۲ و ۳: دو نمونه از جدایه‌های مورد مطالعه، ستون ۴: کنترل مثبت)

در جدول ۳ ارتباط بین جنسیت افراد و حضور ژن tst نشان شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که وجود ژن tst در زنان و مردان تفاوت معناداری ندارد (p=۰/۴).

جدول ۳. توزیع فراوانی ژن tst برحسب جنس

جنس	زن		مرد		جمع	
ژن	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
مثبت	۶	۱۱/۵	۸	۱۶/۷	۱۴	۱۴
منفی	۴۶	۸۸/۵	۴۰	۸۳/۳	۸۶	۸۶
کل	۵۲	۱۰۰	۴۸	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که وجود ژن tst در زنان و مردان تفاوت معناداری ندارد (p=۰/۴).

تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

در این تست بیشترین میزان مقاومت جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین بوده است و ۱۰۰ ٪ جدایه‌ها نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. همچنین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین ۹۲ ٪، پنی-

سیلین ۸۰ ٪، سیپروفلوکساسین ۷۹ ٪، تتراسایکلین ۷۸ ٪، جنتامایسین ۷۵ ٪، کلیندامایسین ۵۸ ٪، سفالکسین ۵۵ ٪، سفازولین ۴۰ ٪، کربنی‌سیلین ۳۰ ٪، کوتریموکسازول ۲۲ ٪ و وانکومایسین ۱۴ ٪ به ترتیب در مراتب بعدی قرار داشتند.

میزان مقاومت جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس حاوی ژن tst نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول مشخص است، بیشترین میزان مقاومت جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس حاوی ژن tst نسبت به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین بوده است و ۱۰۰ ٪ جدایه‌ها نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند و کمترین مقاومت آنتی-بیوتیکی مربوط به وانکومایسین (۱۴/۳ ٪) می‌باشد. فراوانی ژن tst در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین ۱۴/۱٪ و در سویه‌های حساس به متی‌سیلین ۱۲/۵ ٪ بود. نتایج آماری نشان داد که در جدایه‌های حاوی ژن tst بین مقاومت به وانکومایسین و کوتریماکسازول با سایر آنتی بیوتیک ها اختلاف آماری معنی داری وجود دارد (p=۰/۰۳۲). آنالیز با نرم افزار spss (نسخه ۱۶) و مدل آماری chi squer در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

جدول ٤. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های استافیلوکوکوس‌اورئوس حاوی ژن tst

آنتی‌بیوتیک	سویه‌های مثبت tst	سویه‌های منفی tst
	۱۴/۱۰۰	۸۶/۱۰۰
	درصد	درصد
	مقاوم	مقاوم
سیپروفلوکساسین	۷۱/۴	۸۰/۲
کلیندامایسین	۵۷/۱	۵۸/۱
تتراسایکلین	۸۵/۷	۷۶/۷
کربنی‌سیلین	۷۱/۴	۲۳/۳
جنتامایسین	۶۴/۳	۷۶/۷
اگزاسیلین	۱۰۰	۱۰۰
متی‌سیلین	۹۲/۹	۹۱/۹
سفازولین	۷۸/۶	۳۳/۷
سفالکسین	۴۲/۹	۵۷
کوتریموکسازول	۲۱/۴	۲۲/۱
وانکومایسین	۱۴/۳	۱۴
پنی‌سیلین	۸۵/۷	۷۹/۱

بحث

استافیلوکوکوس‌اورئوس پاتوژنی بسیار قوی در ایجاد عفونت-های اکتسابی از جامعه و بیمارستان بوده و باعث طیف وسیعی از بیماری‌ها از عفونت‌های پوستی گرفته تا عفونت‌های شدید و تهاجمی مثل سپتی‌سمی، پنومونی، اندوکاردیت و آبسه‌های عمقی در بدن انسان می‌گردد. از دیدگاه مولکولی، این باکتری واجد ژن‌هایی است که در ایجاد حدت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید انواع توکسین نقش دارند (۹).

بیماری‌زایی این باکتری به فاکتورهای ویرولانس متعدد آن مربوط است که باعث می‌شوند این باکتری به سطوح متصل شود، از سیستم ایمنی میزبان فرار کند و تاثیرات سمی و خطرناکی بر میزبان گذارد (۱۰).

در مطالعه حاضر، به منظور بررسی الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع ژن کد کننده توکسین شوک سمی، ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس‌اورئوس از بیمارستان‌های اصفهان جمع-آوری شد. پس از جداسازی توسط روش‌های معمول رنگ-آمیزی گرم و آزمون کاتالاز، تائید مولکولی جدایه‌ها و وجود ژن tst توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی شد.

در این مطالعه از میان ۱۰۰جدایه استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده از تراشه‌های تنفسی، ۱۴ مورد حاوی ژن tst بودند که ۱۴٪ کل نمونه‌ها را شامل می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که ۴۸٪ نمونه‌های مورد مطالعه مربوط به زنان و ۵۲ ٪ مربوط به مردان بودند که از این میان ۴۲/۹٪ از سویه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس tst مثبت را زنان و ۵۷/۱ ٪ را مردان

تشکیل می‌دهند که این مقادیر اختلاف معناداری با هم ندارند، چرا که تعداد نمونه‌های مردان تقریبا برابر نمونه‌های مورد مطالعه زنان بود.

در سال ۲۰۰۵، Deurenberg و همکاران ۱۰۳ سویه استافیلوکوکوس‌اورئوس را که از جامعه و بیمارستانی در هلند جدا شده بود، مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که ۲۴ ٪ سویه‌های جدا شده از جامعه و ۱۴ ٪ سویه‌های جدا شده از بیمارستان، tst مثبت می‌باشند (۱۱). این در حالی است که در مطالعه‌ای دیگر Islam و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در بنگلادش، از ۳۰ سویه استافیلوکوکوس‌اورئوس کواگولاز مثبت، تنها یک سویه (۳/۳۳ %) tst مثبت جدا نمودند (۱۲).Parsonnet و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ژاپن ۱۵۹ سویه استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده از زنان را مورد بررسی قرار دادند که ۹ ٪ سویه ها tst مثبت گزارش شدند (۱۳). Peck و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در طول پنج ماه به بررسی ۷۰ نمونه کلینیکی جمع آوری شده از افراد بستری در بیمارستانی در کره پرداختند که ۴۴/۳٪ نمونه ها حاوی ژن tst بودند (۱۴). در مطالعه Rall و همکارانش در برزیل در سال ۲۰۱۰ بین ۸۰ سویه استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده از منابع کلینیکی، نمونه های غذایی و سواب بینی، ۵۳ سویه (۶۶/۲۵ %) حاوی ژن های انتروتوکسین و tst بودند (۱۵). Teyhoo و همکارانش در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که ژن tst توسط۲۰ ٪ جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس در تبریز وجود داشته است (۱۶). در بررسی نوروزی و همکاران در ۲۰۱۲ از ۸۰ سویه استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده، ۱۴ سویه (۲۶/۴۱ ٪) دارای ژن tst بودند (۱۷).

اساس درمان مناسب در کلیه عفونت‌ها، انتخاب یک آنتی‌بیوتیک با کارایی بالا و ارزان می‌باشد و با توجه به افزایش روزافزون مصرف آنتی‌بیوتیک و متعاقب آن افزایش مقاومت-های آنتی‌بیوتیکی و متفاوت بودن حساسیت استافیلوکوکوس‌اورئوس در مناطق مختلف دنیا، مطالعه بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی این باکتری، ضروری به نظر می‌رسد و بدین جهت در این پژوهش نیز سویه‌های جدا شده از نظر مقاومت دارویی مورد بررسی قرار گرفتند. در این راستا آنتی-بیوتیک‌هایی از گروه‌های مختلف مانند گروه بتالاکتام‌ها (پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها)، بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف، آمینوگلیکوزیدها، کینولون‌ها، تتراسایکلین‌ها و نیز آنتی‌بیوتیک-های ویژه عفونت تنفسی انتخاب شدند.

در دنیای امروز ارتباط مستقیمی بین میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود دارد. در میان میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، نگرانی ویژه‌ای در مورد استافیلوکوکوس‌اورئوس وجود دارد، چرا که این ارگانیسم توانایی کسب مقاومت در برابر کلاس‌های گوناگون آنتی‌بیوتیکی را داراست (۱۸).

تمام جدایه‌های مورد مطالعه جهت تست حساسیت و مقاومت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک، مورد آنتی‌بیوگرام قرار گرفتند. مقاومت کل سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین ۹۲٪، پنی‌سیلین ۸۰٪، سیپروفلوکساسین ۷۹٪، تتراسایکلین ۷۸٪، جنتامایسین ۷۵٪، کلیندامایسین ۵۸٪، سفالکسین ۵۵٪، سفازولین ۴۰٪، کربنی‌سیلین ۳۰٪، کوتریموکسازول ۲۲٪ و وانکومایسین ۱۴٪ به ترتیب در مراتب بعدی قرار داشتند. همچنین مقاومت ۱۰۰ درصدی کلیه سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین مشاهده شد. بنابراین در مطالعه حاضر بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی-بیوتیک‌های اگزاسیلین و متی‌سیلین و کمترین مقاومت مربوط به وانکومایسین و کوتریموکسازول بود.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ توسط Fey و همکارانش صورت گرفت، گزارش شد که از میان نمونه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس آزمایش شده، ۸۱٪ به پنی‌سیلین و اگزاسیلین مقاوم بودند و نیز مقاومت به هر دو آنتی‌بیوتیک کلیندامایسین و سیپروفلوکساسین ۶٪ بوده و هیچ جدایه‌ای مقاومت چندگانه نداشت (۱۹). برینک[1] و همکاران در سال ۲۰۰۷ شیوع مقاومت نسبت به متی‌سیلین را در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس در سراسر آفریقای جنوبی ۳۶٪ گزارش نمودند (۲۰). در مطالعه زمانی و همکاران در سال ۲۰۰۷

[1] Brink

در همدان، شیوع مقاومت به متی‌سیلین در میان جدایه بیمارستانی ۳۱/۴ ٪ بوده است (۲۱).

فتح ا.. زاده و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی تهران، شیوع جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین را در سال ۲۰۰۸ در شهر تهران، ۳۶٪ گزارش نمودند (۲۲). در سال ۲۰۰۸، علی‌قلی و همکاران شیوع جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین را در شهر تهران ۴۱/۸۵٪ گزارش نمودند (۲۳). در مطالعه صادری و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹، ۴۹٪ جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس در شهر تهران مقاوم به متی‌سیلین گزارش شدند (۲۴). هوایی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ میزان شیوع جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین را در بیمارستان‌های اصفهان ۲۰٪ گزارش نمودند (۲۵). این آمار نشان دهنده شیوع و گسترش متفاوت این جدایه‌ها در ایران می‌باشد. جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در بیماران بیمارستان (به خصوص در بخش‌هایی مانند جراحی، مراقبت‌های ویژه، پیوند اعضا، سرطان و شیمی درمانی) به علت آسیب‌پذیر بودن نسبت به عفونت‌های ناشی از این جدایه‌ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند.

در مطالعه حاضر که بر روی ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس‌اورئوس جداسازی شده از بیمارستان‌ها در شهر اصفهان به انجام رسیده است، شیوع جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۹۲٪ تعیین گردید. بر این اساس آمار متفاوتی از شیوع جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس در کشورهای مختلف در اختیار می-باشد. به عنوان مثال در کشورهای آسیایی همچون عربستان سعودی و هند این آمار به ترتیب ۸ و ۴۴٪ گزارش شده است (۲۷-۲۶).

Teyhoo و همکاران در تبریز در سال ۲۰۱۱ بر روی ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس‌اورئوس مطالعه‌ای انجام دادند که نتایج حاصل نشان داد تمام جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک لاینزولید حساس و ۸۳ ٪ آنها به متی سیلین مقاوم بودند (۱۶).

در مطالعه و رضازاده وهمکاران در سال ۲۰۱۳ از بین ۱۰۰ نمونه شناسایی شده، تعداد ۸۰ نمونه استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی گردید که بیشترین میزان مقاومت این سویه ها نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی سیلین (٪۱۰۰) و تتراسایکلین (٪۸۸/۵) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۵/۷ ٪) گزارش شد (۲۸). ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی در مطالعه Ahmadi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (٪۹۰) و متی‌سیلین (٪۶۴) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفورانتوئین (٪۸) و وانکومایسین (٪۱۴) وجود دارد (۲۹).

در مطالعه وحدانی و همکاران، بیشترین مورد جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان متعلق به خلط (٪۴۱) بود (۳۰). مطالعه اورِت[1] وهمکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که ۶۰/۱٪ از جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از زخم‌های جراحی و سوختگی، ۱۵/۵٪ از نمونه‌های ادرار و ۶/۶٪ از نمونه‌های تنفسی فوقانی جداسازی شدند (۳۱). در مطالعه کیم[2] و همکاران در کره جنوبی در سال ۲۰۰۷، ۵۱٪ جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان از نمونه‌های تنفسی و ۳٪ جدایه‌ها نیز از ترشحات چشم به دست آمدند، در حالی که ۳۳٪ جدایه استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از جامعه از عفونت گوش و ۱۹٪ نیز از کودکان مبتلا به عفونت چشم جداسازی شدند (۳۲). این در حالی است که بر پایه نتایج به دست آمده توسط پِنگ[3] و همکاران در سال ۲۰۱۰ در چین، ۷۵٪ از جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان از دستگاه تنفسی و ۷٪ نیز از زخم جداسازی شدند (۳۳).

[1] Orett
[2] Kim
۳ Peng

امروزه افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها یک معضل جهانی است که در اثر مصرف بی‌رویه و روزافزون داروهاست و متاسفانه کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست که تجویز زیاد داروها توسط پزشکان و استفاده ناصحیح آنتی-بیوتیک‌ها توسط بیماران باعث شیوع سویه‌های مقاوم در جامعه نیز شده است.

از طرفی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای دامی باعث شده که حتی باکتری‌هایی که در بدن به صورت فلور هستند نیز به داروها مقاوم شده و مخزنی برای انتشار سویه‌های مقاوم به دارو در جامعه باشند و حتی ممکن است منجر به عود مکرر عفونت-های مختلف در افراد شوند؛ و از سویی دیگر باعث می‌شود آنتی‌بیوتیک‌های بسیار مناسب و کم‌عوارض و ارزان را از دست بدهیم. در این میان آموزش و آگاهی به افراد جامعه و حتی کادر پزشکی می‌تواند به کنترل ظهور این بیماری‌های مقاوم در جامعه کمک کند. همچنین ضمن استاندارد شدن روش‌های آنتی‌بیوگرام در جامعه، پزشکان نیز باید به نتایج تست حساسیت ضد میکروبی عفونت‌های مختلف از جمله عفونت تنفسی جهت کاربرد صحیح آنتی‌بیوتیک موثر، توجه ویژه‌ای داشته باشند.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد در جدایه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس جمع‌آوری شده در ایران، ژن‌های tst وجود داشته و این سویه‌ها نیز شیوع بالایی دارند. در مجموع شیوع بسیار بالای جدایه‌های MRSA و حتی متاسفانه MRSAهای tst مثبت در بیمارستان‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که این جدایه‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه را نیز از خود بروز می‌دهند. از آنجایی که این فاکتور ویرولانس قابل انتقال به استافیلوکوکوس اورئوس‌های دیگر نیز می‌باشد، بنابراین خطر اپیدمی آلودگی با چنین جدایه‌هایی در بیمارستان و نیز در بین بیماران بستری شده وجود دارد و پزشکان باید جهت تدابیر درمانی مناسب، آگاهی حاصل نمایند.

تقدیر و تشکر

از استاد گران‌قدر جناب آقای دکترسید حسین حجازی، عضوهیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده علوم پزشکی که درانجام این تحقیق حمایت‌های لازم را مبذول فرمودند، سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Kwiecinski J, Jin T, Josefsson E. Surface proteins of Staphylococcus aureus play an important role in experimental skin infection. APMIS 2014; 122:1240-50.
2. Kobayashi SD, Malachowa N, Deleo FR. Pathogenesis of Staphylococcus aureus abscesses. Am J Pathol 2015; 185:1518-27.
3. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. Asian Pacific J Trop Biomed 2015; 5:509-14.
4. Morgenstern M, Erichsen C, Hackl S, Mily J, Militz M, Friederichs J, et al. Antibiotic resistance of commensal Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci in an international cohort of surgeons: a prospective point-prevalence study. PLoS One 2016; 11:e0148437.
5. Lacey KA, Geoghegan JA, Mcloughlin RM. The role of Staphylococcus aureus virulence factors in skin infection and their potential as vaccine antigens. Pathogens 2016; 5:E22.
6. Kulhankova K, King J, Salgado-Pabon W. Staphylococcal toxic shock syndrome: superantigen-mediated enhancement of endotoxin shock and adaptive immune suppression. Immunol Res 2014; 59:182-7.
7. Tilahun AY, Karau M, Ballard A, Gunaratna MP, Thapa A, David CS, et al. The impact of Staphylococcus aureus-associated molecular patterns on staphylococcal superantigen-induced toxic shock syndrome and pneumonia. Mediators Inflamm 2014; 2014:468285.
8. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbial 2000; 38:1032-5.

9. Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsa-nguan M, Tungtrongchitr A, Voravuthikunchai SP, et al. Staphylococcus aureus clinical isolates: antibiotic susceptibility, molecular characteristics, and ability to form biofilm. Biomed Res Int 2013; 2013:314654.

10. Andrey DO, Renzoni A, Monod A, Lew DP, Cheung AL, Kelley WL. Control of the Staphylococcus aureus toxic shock tst promoter by the global regulator SarA. J Bacteriol 2010; 192:6077-85.

11. Deurenberg RH, Nieuwenhuis RF, Driessen C, London N, Stassen FR, van Tiel FH, et al. The prevalence of the Staphylococcus aureus tst gene among community and hospital-acquired strains and isolates from Wegener-s Granulomatosis patients. FEMS Microbiol Lett 2005; 245:185-9.

12. Islam MJ, Uddin MS, Nasrin MS, Nazir KH, Rahman MT, Alam MM. Prevalence of enterotoxigenic and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 producing coagulase positive Staphylococcus aureus in human and their characterization. Bangladesh J Veterin Med 2007; 5:115-9.

13. Parsonnet J, Goering RV, Hansmann MA, Jones MB, Ohtagaki K, Davis CC, et al. Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) producing strains of Staphylococcus aureus and antibody to TSST-1 among healthy Japanese women. J Clin Microbiol 2008; 46:2731-8.

14. Peck KR, Baek JY, Song JH, Ko KS. Comparison of genotypes and enterotoxin genes between Staphylococcus aureus isolated from blood and nasal colonizers in a Korean hospital. J Korean Med Sci 2008; 24:585-91.

15. Rall VL, Sforcin JM, Augustini VC, Watanabe MT, Fernandes A Jr, Rall R, et al. Detection of enterotoxin genes of Staphylococcus sp. isolated from nasal cavities and hands of food handlers. Braz J Microbiol 2010; 41:59-65.

16. Teyhoo M, Mobin H, Mozafari NA, Moadab SR, Sedigh Bayan KH, Mones Rast SH. The prevalence of Toxin Shock Syndrome oxin (TSST-1) producing clinical isolates of Staphylococcus aureus strains Isolated from Shohada Hospital in Tabriz, Iran. Med Lab J 2011; 5:38-44 (Persian).

17. Nowroozi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. Isolation and detection of Staphylococcus aureus enterotoxins AE and TSST-1 genes from different sources by PCR method. Qom Univ Med Sci J 2012; 6:78-85 (Persian).

18. Tikofsky LL, Barlow JW, Santisteban C, Schukken YH. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for Staphylococcus aureus in organic and conventional dairy herds. Microb Drug Resist 2003; 9:39-45.

19. Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, et al. Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:196-203.

20. Brink A, Moolman J, da Silva MC, Botha M. Antimicrobial susceptibility profile of selected bacteraemic pathogens from private institutions in South Africa. S Afr Med J 2007; 97:273-9.

21. Zamani A, Sadeghian S, Mosleh MN, Goodarzi MT, Yousefi Mashouf R, Ghaderkhani J. Detection of methicillin-resistance gene (mec-A) in Staphylococcus aureus strains by PCR and determination of antibiotic sensitivity. Sci J Hamadan Univ Med Sci 2007; 14:54-8.

22. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) analysis antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2008; 14:217-20.

23. Aligholi M, Emaneini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, Sedaghat H. Emergence of high-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the Imam Khomeini hospital in Tehran. Med Princ Pract 2008; 17:432-4.

24. Saderi H, Owlia P, Eslami M. Prevalence of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance in S. aureus isolated from patients in Tehran, Iran. Iran J Pathol 2009; 4:161-6.

25. Havaei SA, Ohadian Moghadam S, Pourmand MR, Faghri J. Prevalence of genes encoding bi-component leukocidins among clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Iran J Public Health 2010; 39:8-14.

26. Al-Tawfiq JA. Father-to-infant transmission of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27:636-7.

27. Tyagi A, Kapil A, Singh P. Incidence of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in pus samples at a Tertiary Care hospital, AIIMS, New Delhi. J Indian Acad Clin Med 2008; 9:33-5.

28. Rezazadeh M, Yousefi MR, Sarmadyan H, Ghaznavirad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr hospital of Arak. Arak Med Univ J 2013; 16:29-37 (Persian).

29. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance pattern in Staphylococcus aureus from clinical samples obtained from patients hospitalized in Imam Reza hospital, Kermanshah. J Microb World 2014; 6:299-311 (Persian).

30. Vahdani P, Saifi M, Aslani MM, Asarian AA, Sharafi K. Antibiotic resistant patterns in MRSA isolates from patients admitted in ICU and infectious ward. Tanaffos 2004; 3:37-44 (Persian).

31. Orett FA, Land M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. BMC Infect Dis 2006; 6:83.

32. Kim ES, Song JS, Lee HJ, Choe PG, Park KH, Cho JH, et al. A survey of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Korea. J Antimicrob Chemother 2007; 60:1108-14.

33. Peng Q, Hou B, Zhou S, Huang Y, Hau D, Yao F, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in a teaching hospital, Shantou, China. Afr J Microbiol Res 2010; 4:844-8.

Original Article

Antibiotic resistance pattern and prevalence of tst gene in Staphylococcus aureus isolated from respiratory system infections in Isfahan

Received:23/08/2017 - Accepted: 27/09/2017

Gorji Sara[1]
Bamzadeh Zahra[2*]
Momtaz Hasan[3*]

1- Master of Science,Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran.
2-Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran.
3-Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran.

* Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran.

Tel: 09136065672
Email: bamzadehz@yahoo.com

Abstract

Introduction: One of the most common infectious diseases in the world, is a respiratory infection that caused by attack of Staphylococcus aureus to the upper respiratory system. Due to the genomic diversity of species and toxins of Staphylococcus aureus strains and increasing antibiotic resistance of this bacterium, rapid detection of bacterium to reduce the transmission and spread of this pathogen in nosocomial infections is essential. The aim of this study was to survey the prevalence of tst gene and detection of antibiotic resistance pattern of Staphylococcus aureus isolates in respiratory system infection.

Materials and Methods: In this study 100 Staphylococcus aureus isolates from patients with respiratory infections were selected and the tst gene was proliferated with polymerase chain reaction and specific primers in this isolates were evaluated through gel electrophoresis. Study of the antibiotic resistance pattern of strains was done using the disk-diffusion method against 12 antibiotics, based on CLSI protocol.

Results: In 14 of the 100 isolates studied, tst gene was identified. Most antibiotic resistance in this strains was oxacillin (100%) and the lowest antibiotic resistance was vancomycin (14.3%).

Conclusion: for producing different toxins in Staphylococcus aureus strains and the increasing antibiotic resistance of this bacterium, early diagnosis and appropriate treatment to prevent the progression of the disease caused by this bacterium is essential.

Keywords: Staphylococcus aureus, tst gene, respiratory system infections, antibiotic resistance pattern

Acknowledgement: *There is no conflict of interest.*