

مقاله اصلی

بررسی توزیع فراوانی ژن tst و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های دستگاه تنفسی در اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۰۵

خلاصه

مقدمه

یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان، عفونت دستگاه تنفسی است که در اثر حمله باکتری‌هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس به دستگاه تنفس فوقانی ایجاد می‌گردد. با توجه به تنوع ژنومی گونه‌ها و توکسین‌های سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس 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 استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت دستگاه تنفسی می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه که در پاییز-زمستان ۱۳۹۴ در بیمارستان‌های اصفهان انجام شد، ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مبتلا به عفونت‌های تنفسی انتخاب و ژن tst با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و پرایمرهای اختصاصی در این جدایه‌ها تکثیر و از طریق ژل الکتروفورز بررسی گردید. بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی 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 استافیلوکوکوس اورئوس 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

استافیلوکوکوس اورئوس، ژن tst، عفونت‌های دستگاه تنفسی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

پی‌نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

سارا گرجی^۱

زهرا بزم 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

مقدمه

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

استافیلوکوکوس اورئوس 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 میکروارگانیزم مکرراً در بیماران بستری شده روی می‌دهد که علی‌رغم درمان آنتی‌بیوتیکی عوارض شدیدی از خود بر جای می‌گذارند. در واقع این باکتری از عوامل بیماری‌زای اصلی در عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی بوده و تقریباً 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 استافیلوکوکوس اورئوس، 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 بیمه‌های درمانی گردیده که این مسئله پزشکان را جهت درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس با محدودیت‌های بسیاری مواجه کرده است. مقاومت این پاتوژن به اغلب داروهای موجود در حال افزایش است (۴).

استافیلوکوکوس اورئوس فاکتورهای ویروالانس متعددی دارد که پاتوژنسیته و کلونیزاسیون باکتری را به آن‌ها نسبت می‌دهند. انترتوکسین‌ها و توکسین سندروم شوک توکسیک (TSST-1) مترشح از این باکتری از فاکتورهای ویروالانس 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 استافیلوکوکوس اورئوس در جامعه به راحتی منتقل شود (۷-۵). مطالعه حاضر با هدف ردیابی این ژن در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس 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 استافیلوکوکوس اورئوس 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 جدایه‌های رشد یافته در محیط TSB و استافیلوکوکوس اورئوس (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 استافیلوکوکوس اورئوس در جدایه های مورد مطالعه آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ با ردیابی ژن *tst* باکتری انجام گرفت (۸).

در این مرحله آزمایش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۲/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (MgCl₂)، 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 پلی مریزاسیون 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 سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۵ ثانیه اجرا گردید. در نهایت به مدت ۴۸۰ ثانیه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. در انتها دمای ۴ درجه سانتی-گراد انتخاب شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *tst* در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس (۸)

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

شناسایی ژن *tst*

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

تکنیک ژن *tst* با مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۱ میکرولیتر 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 پلی مریزاسیون 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 سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه اجرا گردید. در نهایت به مدت ۶۰۰ ثانیه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. در انتها دمای ۴ درجه سانتی-گراد انتخاب شد.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *tst* در جدایه-

های استافیلوکوکوس اورئوس (۸).

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

الکتروفورز محصول PCR

محصول PCR مربوط به هر مرحله از انجام آزمایش PCR روی ژل ۱٪ آگارز الکتروفورز گردید. الکتروفورز نمونه ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً 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.

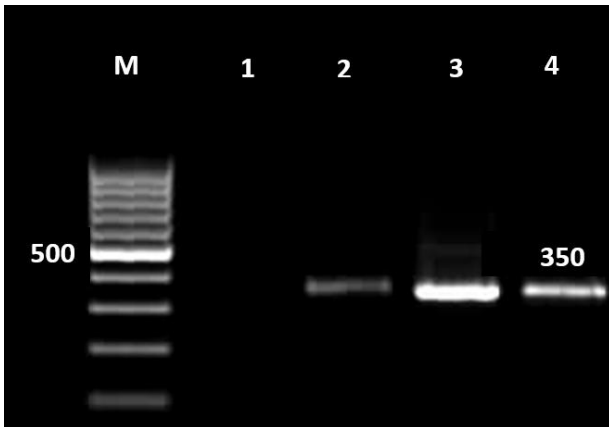
تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های استافیلوکوکوس

اورئوس

حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس به روش دیسک ساده (کری- بائر) و بر اساس استانداردهای CLSI نسبت به ۱۲ آنتی بیوتیک کوتریموکسازول (۲۵μg)، سیپروفلوکساسین (۵μg)، کلیندامایسین (۲μg)، تتراسایکلین (۳۰μg)، جنتامایسین (۱۰μg)، اگزاسیلین (۱μg)، متی سیلین (۵μg)، سفازولین (۳۰μg)، سفالکسین (۳۰μg)، کرنی سیلین (۱۰۰μg)، وانکومایسین (۱۰μg) و پنی سیلین G (۱۰ واحد)

شناسایی ژن *tst*

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



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

در جدول ۳ ارتباط بین جنسیت افراد و حضور ژن *tst* نشان شده است. تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که وجود ژن *tst* در زنان و مردان تفاوت معناداری ندارد ($p=0/4$).

جدول ۳. توزیع فراوانی ژن *tst* بر حسب جنس

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

تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که وجود ژن *tst* در زنان و مردان تفاوت معناداری ندارد ($p=0/4$).

تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

در این تست بیشترین میزان مقاومت جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک اگراسیلین بوده است و ۱۰۰٪ جدایه ها نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. همچنین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین ۹۲٪، پنی-

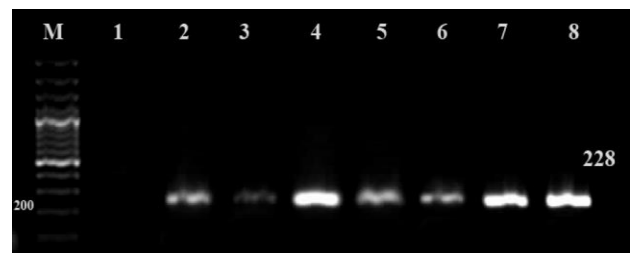
بررسی شد.

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 مک فارلند به دست آمد. سپس سواب استریل به سوسپانسیون باکتری آغشته شد و به صورت متراکم بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک های آنتی-بیوتیکی با استفاده از پنس استریل بر روی محیط قرار داده شدند و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از این مدت، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه گیری شد (۹).

نتایج

در ۱۰۰ نمونه کشت داده شده، بر پایه نتایج رنگ آمیزی گرم و خصوصیات بیوشیمیایی آلودگی با استافیلوکوکوس اورئوس یافت شد که هر ۱۰۰ جدایه از نظر مولکولی با ردیابی ژن *tstDNA* استافیلوکوکوس اورئوس به تایید رسیدند (تصویر ۱).

بر پایه سن و جنس افراد مورد مطالعه، ۵۲٪ جدایه ها متعلق به مردان بوده و ۴۸٪ جدایه ها نیز از زنان جداسازی شدند. ۴۵٪ جدایه ها 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 *tstDNA* استافیلوکوکوس اورئوس روی ژل آگارز ۱٪ (ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱: کنترل منفی، ستون های ۲ تا ۷: نمونه های مورد مطالعه، ستون ۸: کنترل مثبت)

۹۱/۹	۹۲/۹	متی سیلین
۳۳/۷	۷۸/۶	سفازولین
۵۷	۴۲/۹	سفالکسین
۲۲/۱	۲۱/۴	کوتریموکسازول
۱۴	۱۴/۳	وانکومایسین
۷۹/۱	۸۵/۷	پنی سیلین

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس 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 ویروالانس 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 استافیلوکوکوس اورئوس 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 پلیمرز بررسی شد.

در این مطالعه از میان ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس 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 استافیلوکوکوس اورئوس tst مثبت را زنان و ۵۷/۱٪ را مردان

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

میزان مقاومت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس 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 استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن tst نسبت به آنتی‌بیوتیک اگراسیلین 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 متی سیلین ۱۴/۱٪ و در سویه‌های حساس به متی سیلین ۱۲/۵٪ بود. نتایج آماری نشان داد که در جدایه‌های حاوی ژن tst بین مقاومت به وانکومایسین و کوتریموکسازول 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 ۴. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های

استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن tst		
مثبت tst سویه‌های	منفی tst سویه‌های	
۱۴/۱۰۰	۸۶/۱۰۰	
درصد	درصد	آنتی‌بیوتیک
مقاوم	مقاوم	
۷۱/۴	۸۰/۲	سیپروفلوکساسین
۵۷/۱	۵۸/۱	کلیندامایسین
۸۵/۷	۷۶/۷	تتراسایکلین
۷۱/۴	۲۳/۳	کربنی سیلین
۶۴/۳	۷۶/۷	جنتامایسین
۱۰۰	۱۰۰	اگراسیلین

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

در سال ۲۰۰۵، Deurenberg و همکاران ۱۰۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس 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 استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت، تنها یک سویه (۳/۳۳٪) *tst* مثبت جدا نمودند (۱۲). Parsonnet و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ژاپن ۱۵۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از زنان را مورد بررسی قرار دادند که ۹٪ سویه‌ها *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٪ نمونه‌ها حاوی ژن *tst* بودند (۱۴). در مطالعه Rall و همکارانش در برزیل در سال ۲۰۱۰ بین ۸۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از منابع کلینیکی، نمونه‌های غذایی و سواب بینی، ۵۳ سویه (۶۶/۲۵٪) حاوی ژن‌های انتروتوکسین و *tst* بودند (۱۵). Teyhoo و همکارانش در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که ژن *tst* توسط ۲۰٪ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در تبریز وجود داشته است (۱۶). در بررسی نروزی و همکاران در ۲۰۱۲ از ۸۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس 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 مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و متفاوت بودن حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس 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 (پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها)، بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف، آمینوگلیکوزیدها، کینولون‌ها، تتراسایکلین‌ها و نیز آنتی‌بیوتیک‌های 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 استافیلوکوکوس اورئوس 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 استافیلوکوکوس اورئوس 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^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۷ شیوع مقاومت نسبت به متی‌سیلین را در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در سراسر آفریقای جنوبی ۳۶٪ گزارش نمودند (۲۰). در مطالعه زمانی و همکاران در سال ۲۰۰۷

¹ Brink

در همدان، شیوع مقاوم به متی سیلین در میان جدایه بیمارستانی ۳۱/۴٪ بوده است (۲۱).

فتح ا. زاده و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی تهران، شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را در سال ۲۰۰۸ در شهر تهران، ۳۶٪ گزارش نمودند (۲۲). در سال ۲۰۰۸، علی قلی و همکاران شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را در شهر تهران ۴۱/۸۵٪ گزارش نمودند (۲۳). در مطالعه صادری و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹، ۴۹٪ جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس در شهر تهران مقاوم به متی سیلین گزارش شدند (۲۴). هوایی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ میزان شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را در بیمارستان های اصفهان ۲۰٪ گزارش نمودند (۲۵). این آمار نشان دهنده شیوع و گسترش متفاوت این جدایه ها در ایران می باشد. جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بیمارستان (به خصوص در بخش هایی مانند جراحی، مراقبت های ویژه، پیوند اعضا، سرطان و شیمی درمانی) به علت آسیب پذیر بودن نسبت به عفونت های ناشی از این جدایه ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند.

در مطالعه حاضر که بر روی ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بیمارستان ها در شهر اصفهان به انجام رسیده است، شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ۹۲٪ تعیین گردید. بر این اساس آمار متفاوتی از شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس 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 (۲۶-۲۷).

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

در مطالعه و رضازاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ از بین ۱۰۰ نمونه شناسایی شده، تعداد ۸۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی گردید که بیشترین میزان مقاومت این سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰۰٪) و تتراسایکلین (۸۸/۵٪) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۵/۷٪) گزارش شد (۲۸). ارزیابی الگوی مقاوت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی در مطالعه Ahmadi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۹۰٪) و متی سیلین (۶۴٪) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های نیتروفوران توئین (۸٪) و وانکومايسين (۱۴٪) وجود دارد (۲۹).

در مطالعه وحدانی و همکاران، بیشترین مورد جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان متعلق به خلط (۴۱٪) بود (۳۰). مطالعه اورت^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که ۶۰/۱٪ از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از زخم های جراحی و سوختگی، ۱۵/۵٪ از نمونه های ادرار و ۶/۶٪ از نمونه های تنفسی فوقانی جداسازی شدند (۳۱). در مطالعه کیم^۲ و همکاران در کره جنوبی در سال ۲۰۰۷، ۵۱٪ جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان از نمونه های تنفسی و ۳٪ جدایه ها نیز از ترشحات چشم به دست آمدند، در حالی که ۳۳٪ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین 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 پنگ^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۰ در چین، ۷۵٪ از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان از دستگاه تنفسی و ۷٪ نیز از زخم جداسازی شدند (۳۳).

¹ Orett

² Kim

^۳ Peng

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 ویرولانسی 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 دکتر سید حسین حجازی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده علوم پزشکی که در انجام این تحقیق حمایت‌های لازم را مبذول فرمودند، سپاسگزاری می‌شود.

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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 عفونت‌های 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 استافیلوکوکوس اورئوس جمع‌آوری شده در ایران، ژن‌های tst وجود داشته و این سویه‌ها نیز شیوع بالایی دارند. در مجموع

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 Microbiol* 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* (*Scmec*) 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 (MLS_B) 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: 22/05/2017 - Accepted: 27/09/2017

Gorji Sara¹
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.*