مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۵۱/هفته‌ی سوم آذر ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۰

تایپینگ مولکولی سویه‌های Staphylococcus Aureus مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان‌های شهر تهران در سال ۱۳۹۵ بر اساس الگوی agr

سارا نصیریان[۱]، سارا سعادتمند[۲]، مهدی گودرزی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Staphylococcus aureus، از جمله شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. افزایش عفونت‌های ناشی از این باکتری و مقاومت آن به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث بروز مشکلات بسیاری شده است. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی مولکولی Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus یا MRSA) جدا شده از بیماران بستری در Intensive care unit (ICU) بیمارستان‌های شهر تهران بود.

روش‌ها: در این پژوهش، ۴۴۳ نمونه‌ی بالینی جهت جداسازی MRSA مورد بررسی قرار گرفت و ۱۲۵ نمونه وارد مطالعه شد. پس از جداسازی MRSA، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جداسازی شده به روش انتشار دیسک در آگار (Disk diffusion) بررسی گردید. در ادامه، تمامی سویه‌های MRSA از نظر وجود ژن‌های کد کننده‌ی توکسین Panton-Valentine leukocidin (PVL) و Toxic shock syndrome toxin (TSST) با استفاده از تکنیک Polymerase chain reaction (PCR) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، تایپینگ agr با استفاده از تکنیک Multiplex PCR تعیین شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۲۲ مورد، ۹۷/۶ درصد)، کانامایسین (۱۰۵ مورد، ۸۴/۰ درصد) و جنتامایسین (۹۵ مورد، ۷۶/۰ درصد) بود. در میان ۱۲۵ گونه‌ی MRSA، شایع‌ترین ژن به tst (۸۴ مورد، ۶۷/۰ درصد) و سپس ژن pvl (۲۵ مورد، ۲۰/۰ درصد) اختصاص یافت. شایع‌ترین نوع agr نیز به تایپ I با فراوانی ۵۲/۰ درصد، تایپ III با فراوانی۳۴/۴ درصد، تایپ II با فراوانی ۹/۶ درصد و تایپ IV با فراوانی ۴/۰ درصد تعلق داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از افزایش قابل توجه مقاومت Staphylococcus aureus نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بود که هشداری جدی جهت درمان عفونت‌های ناشی از Staphylococcus aureus می‌باشد. بنابراین، سیاست مصرف این آنتی‌بیوتیک‌ها باید مورد بازبینی قرار گیرد. همچنین، الگوی تولید توکسین و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های با agr تایپ مختلف، متفاوت بود و پیشنهاد می‌شود که خصوصیات مولکولی سویه‌ها به صورت دوره‌ای مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: Staphylococcus aureus، مقاومت به متی‌سیلین، تایپینگ مولکولی

ارجاع: نصیریان سارا، سعادتمند سارا، گودرزی مهدی. **تایپینگ مولکولی سویه‌های Staphylococcus Aureus مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان‌های شهر تهران در سال ۱۳۹۵ بر اساس الگوی agr.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۵۱): ۱۴۲۴-۱۴۳۱

مقدمه

Staphylococcus aureus یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های کسب شده از بیمارستان (Hospital-acquired) می‌باشد. عفونت‌های استافیلوکوکی اغلب به صورت حاد، تب‌زا و در صورت عدم درمان، قابل انتشار به بافت‌های مجاور و سایر بافت‌ها از طریق باکتریمی هستند. به طور کلی، بیماری های ناشی از این باکتری طیف بسیار وسیعی دارد؛ به طوری که می‌تواند از یک عفونت زخم، جوش و آبسه تا سپتی‌سمی، پنومونی، سندرم شوک سمی، مسمومیت غذایی، باکتریمی، اندوکاردیت و عفونت مجرای ادراری (Urinary tract infections یا UTI) متفاوت باشد (۱). Staphylococcus aureus مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها و فلوروکوئینولون‌ها از خود نشان

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مهدی گودرزی
Email: gudarzim@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

می‌دهد. بنابراین، امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومایسین به عنوان داروهای مؤثر در دسترس هستند. اگرچه امروزه مقاومت به ونکومایسین در برخی از سویه‌های Staphylococcus aureus نیز شناسایی شده است (۲).

یکی از مهم‌ترین مقاومت‌ها در بین ایزوله‌های بالینی Staphylococcus aureus، مقاومت به متی‌سیلین است؛ به طوری که Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus یا MRSA)، یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی جامعه به شمار می‌رود. مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌ها به دلیل پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin binding proteins یا PBPs) تغییر شکل یافته ایجاد می‌شود. مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در ایزوله‌های بالینی Staphylococcus aureus برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ و تنها چند سال پس از شروع تجویز متی‌سیلین در انگلستان مشاهده شد و اکنون سویه‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک، به عنوان یک عامل عفونت بیمارستانی در بخش‌هایی از بیمارستان به خصوص بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive care unit یا ICU) مطرح می‌باشد. از آن زمان، فراوانی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین به طور مداوم افزایش یافت؛ به طوری که عفونت‌های بیمارستانی گسترده‌ای از این باکتری در نقاط مختلف دنیا در دهه‌ی ۱۹۷۰ گزارش شد (۳).

ایزوله‌های MRSA معضلی جدی در دنیا محسوب می‌شود. مطابق با آمارهای جهانی، میزان مرگ و میر ناشی از سویه‌های MRSA حدود ۰/۴ تا ۲۰ درصد برآورد شده است. اگرچه میزان بروز این سویه‌ها در مناطق مختلف و بیمارستان‌های مختلف یکسان نیست، اما در مجموع این میزان در تمام دنیا رو به افزایش است. امروزه با وجود تلاش‌های فراوان در کنترل عفونت‌ها، پراکندگی این سویه‌ها پیوسته در حال افزایش است و تغییرات جغرافیایی، تأثیر زیادی بر این امر دارد. بنابراین، MRSA در کنار ایزوله‌های حساس، قادر است مشکلات عدیده‌ای را برای عفونت‌های بیمارستانی پدید آورد (۴).

Staphylococcus aureus قادر به تولید طیف وسیعی از توکسین‌ها (که نقش بسیار مهمی در ایجاد بیماری در میزبان دارند) می‌باشد. سوپرآنتی‌ژن‌های پیروژنیک (Pyrogenic toxin superantigens یا PTSAgs)، گروهی از اگزوتوکسین‌ها هستند که توسط Staphylococcus aureus تولید می‌شوند و شامل انواع مختلف انتروتوکسین و سم Toxic shock syndrome toxin-۱ (TSST-۱) می‌باشند. این توکسین‌ها توانایی بالایی برای بیماری‌زایی در انسان و حیوانات دارند. سندرم شوک توکسیک ناشی از توکسین TSST-۱، نوعی اختلال حاد و کشنده است که به علت کاهش غیر طبیعی حجم خون، منجر به نارسایی عملکرد بسیاری از ارگان‌ها و در نهایت، مرگ می‌شود. از دیگر توکسین‌های مهم تولید شده توسط این باکتری می‌توان به Panton-Valentine leukocidin (PVL) اشاره کرد. این لکوسیدین شامل دو جزء پروتئینی S و F است که تحت کنترل ژن‌های LukF/PV و LukS/PV می‌باشد. این توکسین نقش بسیار مهمی در تخریب غشای سلول‌های انسانی مانند نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و مونوسیت‌ها دارد و در غلظت‌های بالا منجر به القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های انسانی می‌گردد.

حداقل سه خانواده از اجزای سیستم های تنظیمی عمومی در بیان ژن‌های ویرولانس باکتری وجود دارد که از جمله مهم‌ترین آن‌ها، سیستم‌های تنظیمی دو جزیی هستند و مهم‌ترین سیستم از بین این سیستم‌ها، Accessory gene regulator (agr) نام دارد که نوعی تنظیم کننده‌ی گلوبال است و در تنظیم تعداد بی‌شماری از عوامل کلونیزاسیون، بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش دارد. استافیلوکوک چهار پلی‌پپتید اصلی دارد که متغیر بودن توالی‌های آن باعث به وجود آمدن حداقل چهار گروه (I، II، III و IV) شده است. این لوکوس می‌تواند در جهت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها با به کارگیری سیستم کوئوروم سنسینگ (Quorum sensing یا QS)، بیشترین مقاومت دارویی را ایجاد کند. به طور خلاصه، محصول agr B و agr D در پردازش و ترشح Autoactivating peptide (AIP) نقش دارند. در مرحله بعد، AIP سبب فسفریلاسیون agr C می‌شود و این مولکول نیز agr A را فعال می‌نماید و agr A نیز سبب فعال شدن پروموترهای P۲ و P۳ می‌گردد (۵). در این باکتری، مقاومت رو به گسترشی در برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مشاهده می‌شود و احتمال ارتباط ناحیه‌ی agr با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطرح گردیده است. با توجه به ضرورت کسب اطلاعات بیشتر در مورد این باکتری، در پژوهش حاضر با استفاده از روش agr تایپینگ، تیپ‌های مختلف MRSA جدا شده از بیماران بستری در بخش ICU بیمارستان‌های شهر تهران شناسایی و خصوصیات تایپ‌ها از نظر مقاومت و پروفایل توکسینی، به منظور بررسی چرخش سویه‌ای خاص در بیمارستان‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی، در طول یک دوره‌ی یک ساله (از اسفند سال ۱۳۹۴ تا دی ماه ۱۳۹۵)، ۱۲۵ سویه‌ی MRSA جدا شده از بیماران بستری در بخش ICU مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های مورد مطالعه از نمونه‌های مختلف مانند خون (۵۳ نمونه، ۴۲/۴ درصد)، کاتتر (۳۲ نمونه، ۲۵/۶ درصد)، گوش (۱۲ نمونه، ۹/۶ درصد)، عفونت‌های زخم (۱۰ نمونه، ۸/۰ درصد)، چرک

Archive of SID
www.SID.ir

(۹ نمونه، ۷/۲ درصد)، مایعات بدن (۷ نمونه، ۵/۶ درصد) و ادرار (۲ نمونه، ۱/۶ درصد) جداسازی گردید. نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن و در کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال یافت. از روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی گرم، بررسی تولید کاتالاز و کوآگولاز و تست DNase و رشد در محیط Mannitol salt agar (MSA) به منظور شناسایی فنوتیپی باکتری مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور شناسایی سویه‌های MRSA، ابتدا تمامی سویه‌ها به روش فنوتیپی و سپس به روش ژنوتیپی با استفاده از تکنیک Polymerase chain reaction (PCR) جهت بررسی وجود ژن mec-A و با استفاده از کیت استخراج کیاژن و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تأیید گردید. تمامی سویه‌ها از نظر وجود ژن‌های fem (مؤثر در سنتز دیواره‌ی سلولی یا در میزان اتولیز باکتری MRSA) و nuc (ژن آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز- کد کننده‌ی نوکلئاز مقاوم به حرارت) جهت تأیید قطعی سویه‌ها با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تأیید قطعی سویه‌های MRSA، مقاومت این سویه‌ها نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک شامل آمپی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، کانامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۵ میکروگرم)، لینزولید (۲ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، تیکوپلانین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگلم)، تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول (۱۰ میکروگرم) و سفتریاکسون (۲۵ میکروگرم) به روش انتشار دیسک در آگار (Disk diffusion) مورد بررسی قرار گرفت و به عنوان کنترل مثبت به منظور صحت انجام کار و همچنین، بررسی کنترل کیفی دیسک‌های آنتی‌بیوتیک، از سویه‌ی Staphylococcus aureus ATCC 25923 استفاده گردید.

سپس تمامی سویه‌های MRSA از نظر وجود ژن‌های کد کننده‌ی توکسین‌های PVL (ژن pvl) و TSST (ژن tst) با توجه به توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعات ایجاد شده در جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفت. سیکل حرارتی به منظور تکثیر ژن‌های توکسین شامل یک مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی دناتوراسیون در دمای ۹۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال در دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه با ۳۰ سیکل تکرار و در پایان، مرحله‌ی گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود. در نهایت، جهت تعیین تایپ‌های مختلف agr، از تکنیک Multiplex PCR و پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد. همچنین، برنامه‌ی دمایی به منظور تکثیر ژن‌های agr شامل دمای دناتوراسیون اولیه‌ی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، پس از آن ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ د قیقه، دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، محصولات به دست آمده با استفاده از روش الکتروفورز و در ژل آگاروز ۱/۵ درصد بررسی گردید. همچنین، از سویه‌های agr type 1 (RN 6390)، agr type 2 (RN 6607)، agr type 3 (RN 8465) و agr type 4 (RN 4850) به عنوان سویه‌های رفرنس در تکنیک تایپینگ agr استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

منبع	محصول اندازه (جفت باز)	توالی پرایمر	پرایمر	Target
۶	۶۴۸	CTTACTTACTGCTGTACCTG	F	fem A
		ATCTCGCTTGTTGTGTGC	R	
۷	۲۷۰	GCGATTGATGGTGATACGGTT	F	nuc A
		AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	R	
۷	۵۸۳	AGAAGATGGTATGTGGAAGTTAG	F	mecA
		ATGTATGTGCGATTGTATTGC	R	
۸	۱۸۰	TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT	F	Luk-PV
		TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	R	
۹	۳۹۸	TTATCGTAAGCCCTTTGTTG	F	TSST-1
		TAAAGGTAGTTCTATTGGAGTAGG	R	
۱۰	-	ATGCACATGGTGCACATGC	Pan F	agr
	۴۴۱	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	R1	
	۵۷۵	TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	R2	
	۳۲۳	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	R3	
	۶۵۹	CGATAATGCCGTAATACCCG	R4	

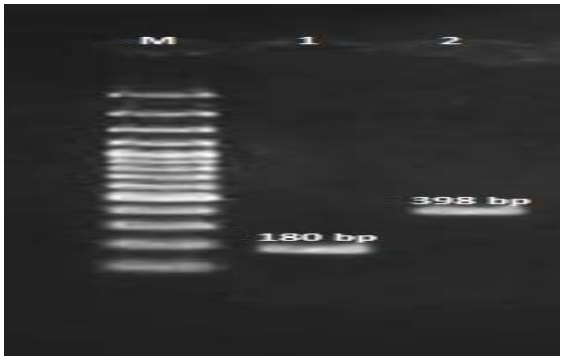
TSST-1: Toxic shock syndrome toxin-1; Luk-PV: Panton-Valentine leukocidin

Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

بیشترین شیوع عفونت MRSA در مطالعه‌ی حاضر بین بیماران با گروه سنی ۲۱ تا ۴۵ سال (۷۱/۲ درصد) و کمترین میزان آن در گروه سنی کمتر از ۲۰ سال (۸/۰ درصد) مشاهده گردید. همچنین، از ۴۴۳ نمونه ی مختلف بالینی مورد بررسی، ۱۲۵ نمونه MRSA جدا شد. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۲۲ مورد، ۹۷/۶ درصد)، کانامایسین (۱۰۵ مورد، ۸۴/۰ درصد)، جنتامایسین (۹۵ مورد، ۷۶/۰ درصد)، اریترومایسین (۸۸ مورد، ۷۰/۴ درصد)، تتراسایکلین (۷۸ مورد، ۶۲/۴ درصد)، کلیندامایسین (۷۰ مورد، ۵۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۶۳ مورد، ۵۰/۴ درصد)، آمیکاسین (۶۰ مورد، ۴۸/۰ درصد)، توبرامایسین (۵۸ مورد، ۴۶/۴ درصد)، سفتریاکسون (۴۹ مورد، ۳۹/۲ درصد)، موپیروسین (۳۲ مورد، ۲۵/۶ درصد)، تریمتوپریم- سولفامتوکسازول (۲۱ مورد، ۱۶/۸ درصد) و کوئینوپریستین- دالفوپریستین (۱۲ مورد، ۹/۶ درصد) گزارش شد. لازم به ذکر است که همه‌ی ایزوله‌ها به تیکوپلانین و لینزولید حساس بودند.

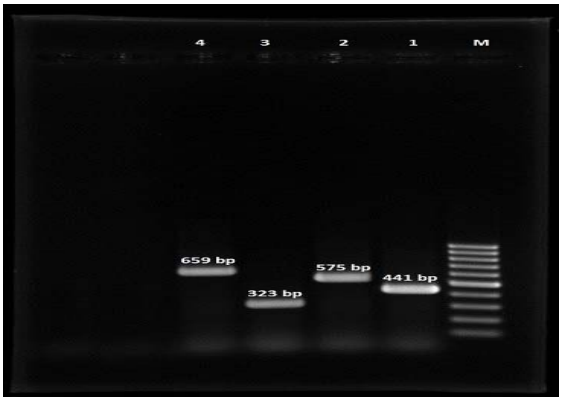
در میان ۱۲۵ گونه‌ی MRSA، شایع‌ترین ژن توکسین، tst (۸۴ مورد، ۶۷/۲ درصد) و پس از آن pvl (۲۵ مورد، ۲۰/۰ درصد) بود که نتایج الکتروفورز این ژن‌ها در شکل ۱ آورده شده است. ژن pvl در سویه‌های MRSA، ۷۲ درصد از عفونت زخم و ۲۸ درصد از خون تشخیص داده شد.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز ژن‌های به دست آمده

باند M: نشانگر ۱۰۰ جفت باز DNA، باند ۱: ژن pvl و باند۲: ژن tst

بر اساس آنالیز Multiplex PCR برای تعیین تایپ‌های مختلف agr مشخص گردید که ۶۵ نمونه (۵۲ درصد) به agr نوع I، ۴۳ نمونه (۳۴/۴ درصد) به agr نوع III، ۱۲ نمونه (۹/۶ درصد) به agr نوع II و ۵ نمونه (۴/۰ درصد) به agr نوع IV اختصاص یافت که نتایج الکتروفورز آن در شکل ۲ ارایه شده است. همچنین، تمام ایزوله‌های حمل کننده‌ی ژن pvl، به agr نوع I اختصاص داشت. ژن کد کننده‌ی توکسین tst نیز بین انواع مختلف agr توزیع شده بود.



شکل ۲. تایپینگ لوکوس agr

باند M: نشانگر ۱۰۰ جفت باز DNA، باند ۱: agr نوع I، باند ۲: agr نوع II، باند ۳: agr نوع III و باند ۴: agr نوع IV

بحث

Staphylococcus aureus به عنوان یک عامل بیماری‌زای قدرتمند که عفونت های متعددی را ایجاد می‌کند، شناخته می‌شود. همچنین، این باکتری در طی چند دهه‌ی گذشته به شایع ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی تبدیل شده است. یکی از عوامل موفقیت این باکتری، کسب فاکتورهای مقاومت می‌باشد؛ بدین صورت که با ورود هر آنتی‌بیوتیک جدید، سویه‌های مقاوم باکتری به سرعت ظهور یافته و درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری را با دشواری مواجه کرده‌اند. به عنوان مثال، با ورود پنی سیلین به بازار و استفاده از این دارو در درمان بیماران بستری، به سرعت سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین ایجاد شدند (۱۱). امروزه در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از Staphylococcus aureus از متی‌سیلین استفاده می‌شود که متأسفانه با ظهور سریع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، این نوع آنتی بیوتیک نیز کارایی خود را از دست داده است. بنابراین، برای مقابله با سویه‌های این باکتری، مطالعات اپیدمیولوژیک و درک نحوه‌ی انتشار و گسترش این باکتری مهم به نظر می‌رسد (۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر، کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تیکوپلانین، موپیروسین و کوئینوپریستین- دالفوپریستین بود که با نتایج تحقیقات Khan و همکاران (۱۳) و Vindel و همکاران (۱۴) همسو بود. بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی به پنی‌سیلین، کانامایسین، جنتامایسین و اریترومایسین اختصاص یافت که با نتایج پژوهش جوان و همکاران (۱۵) همخوانی داشت، اما در رابطه با اریترومایسین، با مطالعه ی Melake و همکاران (۱۶) مشابه نبود. کاهش حساسیت این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، اریترومایسین، سفالوتین و سفتازیدیم شاید به این دلیل باشد که در ایران از این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از این سویه و سایر عفونت های ایجاد شده توسط باکتری‌های دیگر، زیاد استفاده می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

در بررسی حاضر، سطح بالای مقاومت به پنی‌سیلین (۹۷/۱ درصد) مشاهده گردید که با نتایج مطالعات انجام شده پیشین در ایران (۷)، ترکیه (۱۷) و ایتالیا (۱۸) مطابقت داشت و می‌تواند به دلیل استفاده‌ی گسترده از بتالاکتام‌ها در بیمارستان‌ها برای درمان عفونت‌های مختلف و در واقع، استفاده‌ی بی‌رویه از این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران باشد. میزان مقاومت به جنتامایسین در تحقیق حاضر، ۴۳ درصد به دست آمد که با نتایج پژوهش گودرزی و همکاران (۱۹) همسو بود، اما بالاتر از موارد گزارش شده در مطالعه‌ی هوایی و همکاران (۲۰) و کمتر از نتایج حاصل شده در تحقیق Wang و همکاران (۲۲-۲۱) می‌باشد. همچنین، مقاومت نسبی نسبت به کانامایسین (۸۴ درصد)، آمیکاسین (۴۸ درصد) و توبرامایسین (۴۶/۴ درصد) در تحقیق حاضر، با مقادیر گزارش شده در مطالعات Ko و همکاران (۲۳) و گودرزی و همکاران (۱۹) مطابقت داشت.

بیشتر مطالعاتی که در کشور ما بر Staphylococcus aureus تولید کننده‌ی توکسین‌های Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) و Staphylococcal enterotoxin B (SEB) و sec انجام شده، اغلب بر روی ایزوله های حیوانی و منابع غذایی بوده است. بنابراین، پژوهش حاضر که به بررسی حضور توکسین های مولد سندرم شوک سمی در بیماران آلوده به عفونت‌های Staphylococcus aureus بستری در بخش ICU بیمارستان‌های شهر تهران پرداخت، از جمله اولین تحقیقات انسانی در این زمینه به شمار می‌رود (۲۳).

نوروزی و همکاران در تحقیق خود، شناسایی ژن tst در Staphylococcus aureus را با روش PCR مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه‌ی آن‌ها از ۸۰ جدایه‌ی مورد بررسی، ۷ جدایه (۵/۲ درصد) دارای ژن tst و ۱۴ جدایه (۳۵/۰ درصد) دارای ژن sec بودند (۲۴). تیهو و همکاران نیز توزیع فراوانی ژن tst در ۱۰۰ جدایه‌ی Staphylococcus aureus را مورد بررسی قرار دادند که نتیجه‌ی آن، حضور ژن tst در ۲۰ جدایه از Staphylococcusهای مورد بررسی (۲۰ درصد) بود (۲۵). شایع‌ترین ژن توکسین در تحقیق حاضر، tst (۶۷/۲ درصد) بود که از مقادیر به دست آمده در مطالعات صورت گرفته در کلمبیا (۱۰/۰ درصد) (۲۶)، مالزی (۰/۵ درصد) (۲۷)، سوئد (۲۲/۰ درصد) (۲۸) و ایران (۵۱/۴ درصد) (۲۹) بالاتر بود.

نتایج تحقیق Shopsin و همکاران در آمریکا نشان داد که ۴۲ درصد سویه‌ها متعلق به agr نوع I، ۲۴ درصد متعلق به agr گروه II و ۳۴ درصد متعلق به agr گروه IV بود و بیشتر مرتبط با سویه‌های تولید کننده‌ی آنزیم اگزوفولیاتیو می‌باشد (۳۰) که در سویه‌های مورد بررسی تحقیق حاضر نیز مشاهده نگردید. در پژوهش Gilot و van Leeuwen که در آمریکا انجام شد، فراوانی گروه‌های مختلف agr شامل ۶۱/۷ درصد agr نوع I، ۸/۴ درصد agr نوع II و ۳۳/۵ درصد agr نوع III بود و agr نوع IV نیز مشاهده نگردید (۳۱). در مطالعه‌ی حاضر، بیشتر ایزوله‌های آزمایش شده به agr نوع I (۵۲ درصد) اختصاص داشت که با نتایج تحقیقات Indrawattana و همکاران (۳۲) و گودرزی و همکاران (۳۳) همخوانی داشت.

طبق بررسی‌های اخیر، گروه‌های اختصاصی agr با عفونت ایجاد شده به وسیله‌ی Staphylococcus aureus مرتبط می‌باشد. مطالعاتی که در این زمینه انجام شده است، نشان می‌دهد که بعضی از تایپ‌های agr با نوع خاصی از بیماری ارتباط دارد. به طور مثال، یک تحقیق در آمریکا به این نتیجه رسیده است که ایزوله‌های Staphylococcus aureus مولد سندرم شوک توکسیک متعلق به agr نوع III و سویه های مولد سندرم فلسی شدن پوست نیز متعلق به agr نوع IV می‌باشد (۳۴). همچنین، نتایج مطالعه‌ی Ben Ayed و همکاران (۳۴) نشان داد که ایزوله های متعلق به agr نوع III، عامل عفونت‌های غیر تهاجمی و ایزوله‌های متعلق agr نوع I، عامل عفونت تهاجمی به خصوص باکتریمی هستند. تفاوت نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های برخی از تحقیقات می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع و محل نمونه‌گیری باشد.

در مطالعه‌ی حاضر، ایزوله‌های دارای PVL متعلق به agr نوع I بودند. همچنین، بیشتر ایزوله‌ها به agr نوع I و بعد از آن به agr نوع III اختصاص داشت که این یافته با گزارش پژوهش‌های Ben Ayed و همکاران (۳۴) و قاسمیان و همکاران (۳۵) همخوانی داشت. تحقیقات مذکور مربوط به پراکندگی agr مبنی بر فراوانی کم نوع II و IV بود. همچنین، در مطالعه‌ی حاضر تمام ژن‌های توکسین بیشتر در agr نوع I مشاهده شد که با نتایج پژوهش نوروزیان و همکاران (۲۹) همخوانی داشت.

این یافته‌ها کمک می‌کند تا فرض کنیم که agr نوع I می‌تواند نقش مهمی در تنظیم توکسین ها و Adhesionهای استافیلوکوکی داشته باشد. در مجموع، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی افزایش مقاومت Staphylococcus aureus نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بود که این مسأله هشداری جدی جهت درمان عفونت های ناشی از Staphylococcus aureus در منطقه می‌باشد. با توجه به این که امروزه در لیستی مبنی بر باکتری‌های مقاوم به دارو در World Health Organization (WHO)، MRSA در اولویت دوم (شدید) قرار گرفته است؛ به منظور جلوگیری از افزایش مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک و سایر آنتی بیوتیک ها، جلوگیری از تجویز بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس و توجه ویژه به ضد عفونی کردن بیمارستان‌ها به ویژه بخش‌های حساس‌تر مانند ICU، امری ضروری می باشد. همچنین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که agr

Archive of SID
www.SID.ir

نوع I در بین ایزوله‌های آزمایش شده با فراوانی بیشتر توکسین، غالب بود و ممکن است برداشت شود که این نوع agr، نقشی ضروری در تنظیم سموم استافیلوکوکی دارد. پیشنهاد می شود برای درک شیوع و اپیدمیولوژی چسبندگی و ژن های سمی در انواع مختلف مولکولی Staphylococcus aureus، مطالعات بیشتری انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی با شماره‌ی ۱۲۲۰۳ و کد اخلاق IR.SBMU. MSP.REC.1396.412 مصوب معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

References

1. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with Staphylococcus aureus in the United States, 2001-2004. J Infect Dis 2008; 197(9): 1226-34.
2. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3581-5.
3. Moodley A, Stegger M, Bagcigil AF, Baptiste KE, Loeffler A, Lloyd DH, et al. Spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. J Antimicrob Chemother 2006; 58(6): 1118-23.
4. Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the mecC gene: Emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. J Antimicrob Chemother 2014; 69(1): 45-50.
5. Honeyman AL, Friedman H, Bendinelli M. Staphylococcus aureus infection and disease. New York, NY: Springer; 2002.
6. Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. Microbiol Res 2006; 161(1): 49-54.
7. Goudarzi M, Goudarzi H, Sa Figueiredo AM, Udo EE, Fazeli M, Asadzadeh M, et al. Molecular characterization of methicillin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from intensive care units in Iran: ST22-SCCmec IV/t790 emerges as the major clone. PLoS One 2016; 11(5): e0155529.
8. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun 2002; 70(2): 631-41.
9. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33(9): 2233-9.
10. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis. J Clin Microbiol 2002; 40(11): 4060-7.
11. dos Santos Soares MJ, da Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. Spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. J Hosp Infect 2000; 44(4): 301-8.
12. Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, et al. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2000; 355(1397): 667-80.
13. Khan S, Rasheed F, Zahra R. Genetic polymorphism of agr locus and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus at two hospitals in Pakistan. Pak J Med Sci 2014; 30(1): 172-6.
14. Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Spain: 2004-12. J Antimicrob Chemother 2014; 69(11): 2913-9.
15. Javan A, Falahati HR, Saifi M, Talebi M, Ebrahimpour G, Pourshafi MR. MECA gene among high level methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from Tehran hospitals. Iran J Infect Dis Trop Med 2010; 15(49): 17-22. [In Persian].
16. Melake NA, Zakaria AS, Ibrahim NH, Salama MA, Mahmoud AZ. Prevalence of Agr specificity groups among in vitro biofilm forming methicillin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from nasal carriers. International Journal of Microbiology Research 2017; 5(2): 76-84.
17. Guney AK, Yildirim T, Durupinar B. A study on class I integrons and antimicrobial resistance among clinical Staphylococci isolates from a Turkish hospital. Clin Microbial 2014; 3:173.
18. Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (HA-MRSA) in Italy. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2009; 8: 22.
19. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Azad M, Goudarzi H, Azimi H. Distribution of spa types, integrons and associated gene cassettes in Staphylococcus aureus strains isolated from intensive care units of hospitals in Tehran, Iran. Arch Clin Infect Dis 2016; 11(4): e38813.
20. Havaei SA, Ghanbari F, Rastegari A, Azimian A, Khademi F, Hosseini N, et al. Molecular typing of hospital-acquired Staphylococcus aureus isolated from Isfahan, Iran. Int Sch Res Notices 2014; 2014: 185272.

Archive of SID
www.SID.ir

21. Wang WY, Chiueh TS, Sun JR, Tsao SM, Lu JJ. Molecular typing and phenotype characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from blood in Taiwan. PLoS One 2012; 7(1): e30394.
22. Wang SJ, Chow LW, Wu MJ. Multiplex PCR for the simultaneous detection of the SEA, SEB, SEC, SED and SEE genes of enterotoxigenic staphylococcus aureus. J Food Drug Anal 2002; 10(3):164-9.
23. Ko KS, Lee JY, Suh JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY, et al. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Asian countries. J Clin Microbiol 2005; 43(1): 421-6.
24. Norouzi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. The isolation and detection of Staphylococcus aureus enterotoxins A-E and TSST-1 genes from different sources by PCR method. Qom Univ Med Sci J 2012; 6 (3):78-85. [In Persian].
25. Teyhoo M, Mobin H, Mozafari N A, Moadab S R, Sedigh Bayan KH, Mones Rast SH. The prevalence of toxin shock syndrome oxin (TSST-1) Producing clinical isolates of Staphylococcus aureus strainsisolated from Shohada Hospital in Tabriz, Iran. Med Lab J 2011; 5(1): 38-44. [In Persian].
26. Jimenez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodriguez EA, Garces CG, Patino LA, et al. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant Staphylococcus aureus isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellin, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106(8): 980-5.
27. Lim KT, Hanifah YA, Mohd Yusof MY, Thong KL. Investigation of toxin genes among methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. Trop Biomed 2012; 29(2): 212-9.
28. Nowrouzian FL, Dauwalder O, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, et al. Adhesin and superantigen genes and the capacity of Staphylococcus aureus to colonize the infantile gut. J Infect Dis 2011; 204(5): 714-21.
29. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. Several virulence factors of multidrug-resistant Staphylococcus aureus isolates from hospitalized patients in Tehran. Int J Enteric Pathog 2015; 3(2): 8-25196.
30. Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, et al. Prevalence of agr specificity groups among Staphylococcus aureus strains colonizing children and their guardians. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 456-9.
31. Gilot P, van Leeuwen W. Comparative analysis of agr locus diversification and overall genetic variability among bovine and human Staphylococcus aureus isolates. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1265-9.
32. 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.
33. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Nasiri MJ, Goudarzi H, Sajadi NR, Dabiri H. Molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from patients with bacteremia based on MLST, SCCmec, spa, and agr locus types analysis. Microb Pathog 2017; 104: 328-35.
34. Ben Ayed S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ennigrou S, Ben Redjeb S. Accessory gene regulator (agr) typing of Staphylococcus aureus isolated from human infections. Arch Inst Pasteur Tunis 2008; 85(1-4): 3-8.
35. Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. Detection of accessory gene regulator groups genes and cassette chromosome mec types among Staphylococcus aureus isolated from intensive care unit patients. Asian Pac J Trop Dis 2015; 5(2): 153-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School
Received: 22.08.2017
Vol. 35, No. 451, 3rd Week, December 2017
Accepted: 01.11.2017

Molecular Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Isolated from Patients Admitted to Intensive Care Units of Hospitals in Tehran City, Iran, Based on agr Pattern

Sara Nasirian[1], Sara Saadatmand[2], Mehdi Goudarzi[3]

Original Article

Abstract

Background: Staphylococcus aureus is one of the most commonly diagnosed infections in hospitals. Increased infections caused by this bacterium and its resistance to many antibiotics is leading to increasing morbidity and mortality in the hospital setting. The aim of this study was to investigate the molecular status of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from patients admitted to intensive care units (ICUs) of hospitals in Tehran City, Iran.

Methods: This cross-sectional study was performed by analyzing 125 MRSA strains isolated from hospitalized patients in ICUs. In vitro antibiotic susceptibility testing of isolates was assessed using Kirby-Bauer disk diffusion method. MRSA strains were genetically typed by agr typing and virulence and adhesion genes profile via conventional polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings: Of 443 clinical studied samples, 125 MRSA strains were observed. The highest resistance rates were observed for penicillin antibodies (122, 97.6%), kanamycin (105, 84.0%), and gentamicin (95, 76.0%). Frequency of pvl and tst genes was 67.2% and 20%, respectively. Type I was the most prevalent agr type (52.0%), followed by type III (34.4%), type II (9.6%), type I 5(5.3%), and type IV (4%). All the isolates carrying Panton-Valentine leukocidin (PVL)-encoding genes and high-level mupirocin-resistance (HLMUPR)-MRSA strains corresponded exclusively to agr type I.

Conclusion: This study demonstrates the increased resistance of Staphylococcus aureus to different antibiotics, which is a serious warning for the treatment of Staphylococcus aureus infection in the region. Therefore, in order to avoid resistance to other antibiotics, uncontrolled and unnecessary administration of antibiotics should be avoided.

Keywords: Staphylococcus aureus, Methicillin resistance, Molecular typing

Citation: Nasirian S. Saadatmand S. Goudarzi M. **Molecular Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Isolated from Patients Admitted to Intensive Care Units of Hospitals in Tehran City, Iran, Based on agr Pattern.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(451): 1424-31.

1- MSc Student, Department of Biology, School of Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Mehdi Goudarzi, Email: gudarzim@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir