Archive of SID

جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از رودخانه زاینده رود در اصفهان در سال ۱۳۹۴

فاتح رحیمی[۱]*، شرمین کریمی[۲]

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، استادیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی مکانیزاسیون کشاورزی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

***نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، f.rahimi@sci.ui.ac.ir
دریافت مقاله: دی نود و چهار پذیرش برای چاپ: اسفند نود و چهار

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توانایی بالایی جهت کسب ژنهای مقاومت نسبت به عوامل ضدمیکروبی مختلف را دارد و به همین دلیل به یکی از مشکلات و معضلات مهم در بیمارستانها در سراسر جهان مبدل شده است. مقاومت نسبت به متی سیلین ناشی از فعالیت ژنهای *mecA* و *mecC* است. ژن *mecA* بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرک و بزرگ است که به عنوان کاست کروموزومی ژن *mec* (SCC*mec*) شناخته می شود. این مطالعه با هدف جداسازی، شناسایی و تایپینگ جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در آب رودخانه زاینده رود و در طی ماه های آبان و آذر سال ۱۳۹۴، به انجام رسیده است.

روش کار: در طی ماه های آبان و آذر ۱۳۹۴، در مجموع سه مرتبه نمونه گیری از آب رودخانه انجام گرفت. جهت جداسازی کلنی ها از سیستم فیلتراسیون استفاده گردید و فیلترها بر روی محیط HiCrome aureus agar واجد ۱ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک اگزاسیلین منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. به منظور شناسایی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید. آزمونهای SCC*mec* تایپینگ و پروفاژ تایپینگ جهت تایپینگ سویه ها استفاده شدند.

یافته ها: در مجموع ۳۸ کلنی بر روی محیط واجد آنتی بیوتیک جداسازی گردید و همگی به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین تأیید شدند. هشتاد و دو درصد سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین واجد SCC*mec* تایپ III و ۱۸ درصد نیز واجد SCC*mec* تایپ IVa بودند. همچنین، پنج پروفاژ تایپ و دو الگوی پروفاژی در میان جدایه ها شناسایی گردید.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده انتشار و تداوم سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در آب رودخانه زاینده رود است. شیوع بالای SCC*mec* تایپ III مؤید منشاء بیمارستانی این جدایه ها است. شیوع سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان که قادر به ایجاد طیف وسیعی از بیماریهای عفونی هستند یک تهدید جدی برای بهداشت عمومی در اصفهان است.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، پروفاژ تایپینگ، SCCmec تایپینگ

مقدمه

رودخانه زاینده رود بزرگترین رودخانه فلات مرکزی ایران است که از کوه های زاگرس مرکزی به ویژه زردکوه بختیاری سرچشمه گرفته و در کویر مرکزی ایران به سمت شرق حدود ۲۰۰ کیلومتر پیش می‌رود و در نهایت به تالاب گاوخونی می ریزد. حوزه رودخانه زاینده رود ۴۱۵۰۰ کیلومتر مربع است. برآورد می شود جریان آب این رودخانه در مطلوب ترین شرایط ۱/۲ کیلومتر مکعب در سال و یا ۳۸ متر مکعب در ثانیه باشد. درحال حاضر برای آبیاری زمینهای کشاورزی استان اصفهان از سدهای آبیاری که بدین منظور احداث گردیده استفاده می شود. از این رودخانه، جهت آبیاری باغها و کشتزارهای داخلی اصفهان، پنج شاخه بزرگ جدا شده است که در گویش اصفهان به آنها مادی می‌گویند. در طی چندین سال اخیر، رودخانه زاینده رود برای مقاطع بلند مدت خشک شده است و تنها در فصول خاص و به مدت محدود جهت

www.SID.ir

Archive of SID

آبیاری مزارع و کشتزارهای منطقه مجددا جریان آب در آن برقرار می شود. با توجه به اهمیت زاینده رود در آبیاری منطقه و استفاده های جانبی آن، سلامت آن بسیار حائز اهمیت است. *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله باکتریهای بیماری زا در انسان و دام محسوب می شود که به واسطه وجود عوامل حدت مختلف قادر به ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها است(۱, ۲). این عوامل حدت، *استافیلوکوکوس اورئوس* را مبدل به یکی از خطرناکترین و بیماری زاترین باکتریهای شناخته شده نموده اند(۳). این باکتری تمایل و استعداد بالایی جهت کسب مقاومت نسبت به عوامل ضدمیکروبی مختلف را دارد و به همین دلیل به یکی از مشکلات مهم در بیمارستانها در سراسر جهان مبدل شده است(۴).

متی سیلین یکی از آنتی بیوتیکهای مهم معرفی شده جهت درمان عفونتهای ناشی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین بود که تنها یک سال پس از معرفی نخستین جدایه مقاوم به آن گزارش گردید و پس از آن در سراسر جهان منتشر شد و به یکی از معضلات مهم بهداشتی مبدل گردید(۲). این پراکندگی و شیوع در ابتدا تنها مربوط به بیمارستانها بود و تمامی جدایه ها به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان مطرح بودند، اما در دهه های اخیر بیشتر توجهات معطوف به سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه بوده است(۵). مقاومت نسبت به متی سیلین ناشی از فعالیت ژنهای *mecA* و *mecC* است (۲). ژن *mecA* بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرک و بزرگ است که به عنوان کاست کروموزومی ژن *mec* (SCC*mec*) شناخته می شود و تاکنون ۱۱ تایپ مختلف از این کاست شناسایی شده است و به عنوان یکی از معیارهای مهم جهت دسته بندی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین استفاده می شود(۲, ۶).

این مطالعه با هدف جداسازی، شناسایی و تایپینگ جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در آب رودخانه زاینده رود در زمان جاری بودن آب رودخانه و در طی ماه های آبان و آذر سال ۱۳۹۴، به انجام رسیده است.

روش کار

در طی ماه های آبان و آذر ۱۳۹۴، در زمان جاری شدن آب در رودخانه زاینده رود، در مجموع سه مرتبه نمونه گیری از آب رودخانه در محدوده سی و سه پل از قسمت میانی رودخانه انجام گرفت. جهت انجام نمونه گیری از ظروف استریل شیشه ای درب آبی استفاده شد و در هر مرتبه نمونه گیری ۱ لیتر از آب رودخانه جمع آوری شد. نمونه گرفته شده در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و در کمتر از ۱ ساعت بررسی شد(۷).

جهت جداسازی کلنی ها از سیستم فیلتراسیون (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) با استفاده از فیلترهای با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون استفاده گردید و نمونه های آب به طور مستقیم و بدون تهیه رقت فیلتر شدند. پس از انجام فیلتراسیون، فیلترها بر روی محیط HiCrome aureus agar (Himedia, India) واجد ۱ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک اگزاسیلین منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. کلنی های مشکی براق واجد هاله به عنوان جدایه های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده سپس بر روی محیط BHI agar (Merck, Darmstadt, Germany) کشت داده شدند. جهت شناسایی جدایه ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *nucA* استفاده گردید(۸).

برای استخراج DNA از جدایه های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* از آزمون جوشاندن بر اساس دستورالعمل معرفی شده توسط رحیمی و همکاران استفاده گردید(۹).

جهت تأیید مقاومت جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از محیط واجد آنتی بیوتیک نسبت به اگزاسیلین، آزمون Disc Diffusion بر اساس دستورالعمل پیشنهاد شده از جانب Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) استفاده شد(۱۰). همچنین، جهت شناسایی ژن *mecA* در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* که نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید(۱۱).

جهت تعیین وجود پروفاژ تایپ های مختلف SGA، SGB، SGF، SGFa، SGFb، SGL و SGD در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، از آزمون Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و دستورالعمل ارائه شده توسط رحیمی و همکاران استفاده گردید(۱, ۲). جهت تعیین تایپ‌های مختلف SCC*mec* و *ccr* از آزمونهای Multiplex-PCR مجزا با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

پرایمرهای اختصاصی و دستورالعملهایی که پیشتر معرفی شدند استفاده گردید (۲, ۶).

یافته ها

در مجموع ۳۸ کلنی سیاه رنگ واجد هاله بر روی محیط HiCrome aureus agar جدا گردیدند و به عنوان جدایه های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین بررسی شدند. از مجموع ۳۸ کلنی جدا شده، ۱۶ کلنی در نمونه گیری اول، ۱۲ کلنی در نمونه گیری دوم و ۱۰ کلنی نیز در نمونه گیری سوم جدا شدند. نتایج آزمونهای PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *nucA* و *mecA* تأیید کننده سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از آب رودخانه زاینده رود بود.

پروفاژ تایپ های SGA، SGB، SGF، SGFa و SGFb شناسایی شده و تمامی سویه ها واجد پروفاژ تایپهای SGB، SGF، SGFa و SGFb بودند و ۱۸ درصد سویه ها نیز واجد پروفاژ تایپ SGA بودند. دو الگوی پروفاژی در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شناسایی شد(جدول ۱).

در مجموع دو SCC*mec* تایپ و دو تایپ *ccr* شناسایی شد(جدول ۱). ۸۲ درصد سویه ها واجد SCC*mec* تایپ III و ۱۸ درصد نیز واجد SCC*mec* تایپ IVa بودند. تمامی سویه های واجد SCC*mec* تایپ IVa در الگوی ۱ پروفاژی قرار گرفتند و حامل پروفاژ تایپ SGA نیز بودند.

جدول ۱- الگوهای پروفاژی در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین.

الگو	*SGA*	*SGB*	*SGF*	*SGFa*	*SGFb*	*SCCmec type*	*ccr type*	تعداد (٪)
۱	۷	۷	۷	۷	۷	***IVa***	۲	۷ (٪۱۸)
۲	-	۳۱	۳۱	۳۱	۳۱	***III***	۳	۳۱ (٪۸۲)

بحث

در این مطالعه موفق به جداسازی و شناسایی ۳۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از آب رودخانه زاینده رود شدیم که این مطالعه نخستین گزارش از شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در این رودخانه است. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر از محیط واجد آنتی بیوتیک استفاده شده است بنابراین امکان ارائه درصد شیوع جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین وجود ندارد. در چند سال گذشته رودخانه زاینده رود فاقد هرگونه جریانی بوده است و تنها در زمانهای خاص و به مدت محدود جهت آبیاری مزارع و استفاده کشاورزان منطقه جاری می شود. این مطالعه در آخرین مرحله از جاری شدن آب رودخانه و در سه زمان مختلف در آبان و آذر ماه ۱۳۹۴ انجام گرفت. تا کنون شیوع جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در میان سویه های بیمارستانی، محیطی، دامی و غذایی در کشور گزارش شده اند(۱-۴, ۶, ۹, ۱۷-۱۲).

شیوع دو تایپ شاخص SCC*mec*، III و IVa، در این مطالعه نشان دهنده حضور سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه و اکتسابی از بیمارستان در آب رودخانه و آلودگی آن با منابع مختلف است. شیوع بالای SCC*mec* تایپ III در مطالعه حاضر مؤید منشاء بیمارستانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین است که پیشتر نیز حضور آنها در منابع مختلف در کشور نشان داده شده است(۲, ۶, ۱۲, ۱۳, ۱۷). بنابراین بیمارستان، همچنان نقش تعیین کننده ای در انتشار عوامل عفونی و مقاومت در کشور و در شهر اصفهان ایفا می نماید. در گزارشهای مختلف در کشور، همواره شیوع جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه پایین بوده است(۲, ۶, ۱۲, ۱۳, ۱۷). در این مطالعه شیوع بالاتری نسبت با سایر مطالعات حاصل شده است. با توجه به اینکه جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه در شهر اصفهان از شیوع نسبتا پایینی برخوردار بوده است، بنابراین این افزایش می تواند

www.SID.ir

Archive of SID

نگران کننده باشد و نشان دهنده روند رو به رشد این جدایه ها در اصفهان باشد. SCC*mec* تایپ IV واجد کوچکترین اندازه کلاستر (۲۴ کیلو باز) است و مستعد دریافت سایر ژنها است، بنابراین در آینده باید منتظر ظهور سویه هایی با خصوصیت های متفاوت باشیم.

در این مطالعه پنج پروفاژ تایپ و دو الگوی پروفاژی مختلف شناسایی شدند که این پروفاژ تایپ ها در سایر مطالعات نیز در کشور گزارش شده اند(۱-۳, ۶, ۱۷-۱۵). در مطالعات قبلی نشان داده شد که حضور پروفاژ تایپ SGA محدود به جدایه هایی بوده است که واجد SCC*mec* تایپ IV بودند و به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه طبقه بندی شدند(۲, ۶, ۱۷)، در این مطالعه نیز هفت جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین واجد SCC*mec* تایپ IVa و همچنین پروفاژ تایپ SGA بودند که مؤید اکتسابی بودن از جامعه است. پروفاژ تایپ SGA رمزکننده پنتون-ولنتاین لوکوسیدین است و بنابراین می تواند به عنوان شاخص سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه در کنار ژن *pvl* مطرح گردد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده شیوع سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی در آب رودخانه زاینده رود است و با توجه به عدم جاری بودن این رودخانه در تمام طول سال احتمال آلوده شدن آن در طی مسیر وجود دارد. با توجه به اینکه در صورت آلوده بودن سد و سرچشمه این رودخانه احتمال جداسازی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین باید بسیار بالاتر از ۳۸ جدایه باشد، لذا بحث آلودگی در طی مسیر توسط عوامل انسانی می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. از آنجا که از آب رودخانه جهت آبیاری مزارع استفاده می شود و همچنین در مناطق پایین دستی در فصول گرم سال ممکن است که جهت شستشو، آب تنی و یا آشامیدن مورد استفاده قرار گیرد، بنابراین ضرورت آگاهی و هشدار دادن به روستائیان بسیار ضروری به نظر می رسد. این جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین که بیشتر منشاء بیمارستانی نیز دارند حامل پروفاژ تایپهای مختلفی هستند که قادر به رمز نمودن عوامل حدت مختلف از قبیل انتروتوکسینها، همولایزین، استافیلوکیناز، پنتون-ولنتاین لوکوسیدین، توکسین سندرم شوک سمی استافیلوکوکی، توکسین فلسی نمودن پوست و لیپاز هستند و بنابراین شیوع چنین سویه هایی می تواند یک هشدار جدی برای بهداشت و سلامت عمومی جامعه در شهر اصفهان باشد.

REFERENCES

1- Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. Archives of Virology. 2012;157(9):1807-11.

2- Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(Pt 6):796-804.

www.SID.ir

Archive of SID

3- Rahimi F, Karimi S. Characteristics of virulence factors in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a referral hospital in Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. In Press.

4- Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(2):144-9.

5- Chen Y-J, Liu K-L, Chen C-J, Huang Y-C. Comparative molecular characteristics of community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from adult patients in northern Taiwan. Medicine. 2015;94(49):e1961.

6- Rahimi F, Bouzari M. Biochemical fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from sewage and hospital in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(7):e19760.

7- Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iranian Biomedical Journal. 2007;11(3):161-7.

8- Zouharova M, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. Zoonoses and Public Health. 2008;55(6):313-9.

9- Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.

10- Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2012.

11- McClure J-A, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(3):1141-4.

12- Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E ,Aligholi M, Modarressi MH, et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microbial Drug Resistance. 2008;14(3):217-220.

www.SID.ir

Archive of SID

13- Japoni A, Jamalidoust M, Farshad S, Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni S, et al. Characterization of SCC*mec* types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Iran. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2011;64(1):28-33.

14- Javidnia S, Talebi M, Saifi M, Katouli M, Rastegar Lari A, Pourshafie MR. Clonal dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients and the hospital environment. International Journal of Infectious Diseases. 2013;17(9):e691-5.

15- Rahimi F. Characterization of resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2016;9(1):e29237.

16- Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M. Prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(1):80-5.

17- Rahimi F, Karimi S. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry in Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2015;10(4):e30885.

www.SID.ir