Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 18(104): 44-53

Determining the Agr Gene Variety (Accessory Gene Regulator) in Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains in Clinical Samples and Carriers Employed in Remedial Centers

Mohammad Reza Arabestani[1*], Mohammad Abdoli Kahrizi[2]

1- Assistant professor, PhD in Medical Bacteriology, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2- M.Sc in Microbiology, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 23 Aug 2015, Accepted: 7 Oct 2015

Abstract

Background: Agr systems, is responsible for control and coordination in production of virulence factors, exotoxins secretory and hemolysins in *Staphylococcus aureus*. The aim of this study was to determine and identify the frequency of *agr* genes in susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in clinical samples and carriers employed in remedial centers.

Materials and Methods: This descriptive study was done among a total of 200 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and healthy carriers in Hamadan. Antibiotic susceptibility pattern of all isolates was determined by disk diffusion methods. After DNA extraction, the presence of *mecA and agr* genes was investigated using PCR. SPSS software package version 20 was used to perform statistical tests.

Results: All 200 *Staphylococcus aureus* strains were susceprible to vancomycin. The prevalence of *mecA* was 50%. The PCR results showed that *agrA* was the most perevalent gene followed by the *agrC* in all isotated *Staphylococcus aureus* strains. None of the isolates harbored the *agrB* and *agrD* gene.

Conclusion: Pathogenesis of *Staphylococcus* is dependent on some proteins other superficial or excreted which under controlling of agr system. In the present study, the feequency of *agrA* gene in the methicillin-resistant strains, methicillin-sensitive strains isolated from clinical samples and carriers employed in remedial centers was higher than the other agr types. Therefore, presumably, *agrA* gene plays an important role Staphylococcal infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Agr* genes, Antibiotic susceptibility, Methicillin-resistance

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
Email: mohammad.arabestani@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۱۱ (شماره پیاپی ۱۰۴)، بهمن ۱۳۹۴، ۵۳-۴۴

تعیین تنوع ژن *agr* (تنظیم کننده ژن فرعی) در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های کلینیکی و ناقلان شاغل در مراکز درمانی

محمد رضا عربستانی[1*]، محمد عبدلی کهریزی[2]

۱- استادیار، دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲- کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سیستم *agr* در *استافیلوکوکوس اورئوس*، مسئول کنترل و هماهنگی تولید فاکتورهای ویرولانس، اگزوتوکسین‌های ترشحی و همولیزین‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه، تعیین و شناسایی فراوانی ژن *agr* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های بالینی و شاغلان مراکز درمانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی بر روی تعداد ۲۰۰ ایزوله جداسازی شده استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های کلینیکی و ناقلان سالم شهر همدان انجام گرفت. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی همه باکتری‌های جدا شده با استفاده از روش دیسک دیفیوژن تعیین شد و پس از استخراج ژنومی سویه‌های جدا شده، ژن‌های *mecA* و *agr* ار طریق روش PCR شناسایی شدند. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: تمامی ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین حساس بودند. میزان شیوع ژن *mecA* در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده ۵۰ درصد بود. با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین فراوانی ژن‌های *agr* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده به *agrA* و سپس *agrC* مربوط بود. *AgrB* و *agrE* در هیچ کدام از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشدند.

نتیجه‌گیری: بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس به طور عمده به تولید تعدادی از پروتئین‌های وابسته به سطح سلول یا ترشح این پروتئین‌ها مربوط می‌باشد که همگی آن‌ها تحت تنظیمات ژن *agr* هستند. در مطالعه حاضر، *agrA* در ایزوله‌های کلینیکی و شاغلان ناقل حساس و مقاوم به متی‌سیلین بیشتر از سایر تایپ‌های *agr* بود، بنابر این، نقش احتمالی *agrA* در ایجاد عفونت استافیلوکوکوس اورئوس با مهم و چشم‌گیر می‌باشد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن‌های *agr*، حساسیت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت به متی‌سیلین

***نویسنده مسئول**: ایران، همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه میکروب شناسی
Email: mohammad.arabestani@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت می‌باشد که باعث بیماری‌های متنوعی در انسان و حیوانات می‌گردد و موجب تهدید سلامتی آن‌ها به همراه خطرات اقتصادی جدی می‌شود(۱). این باکتری یک پاتوژن مقاوم است که باعث عفونت‌هایی از قبیل اندوکاردیت، مننژیت، سندرم شوک توکسیک و همچنین منجر به ایجاد عفونت‌های التهابی در انسان می‌شود(۲). در میان ژن‌های مرتبط با ویرولانس استافیلوکوک اورئوس، ژن تنظیم کننده *agr* سنتز بسیاری از فاکتورهای ویرولانت رادر طی رشد باکتری‌ها بر عهده دارد. به علاوه، بیان پروتئین‌های وابسته به دیواره سلولی و خارج سلولی در استافیلوکوک به وسیله لوکوس *agr* کنترل می‌شود(۳، ۴). بیماری‌زایی استافیلوکوک اورئوس مربوط به پروتئین‌های وابسته به سطح به صورت کمپلکس در اتصال باکتری به بافت میزبان و ترشح توکسین است که باعث بیماری می‌شود(۵). بیان پروتئین‌های بیماری‌زا تحت کنترل RNA III است که یک تنظیم کننده چند گرایشی مرکزی است که از لوکوس *agr* رونویسی شده است. RNA III به وسیله حداقل دو سیستم فعال می‌شود، یکی *agrA* و *agrC* که به وسیله سیستم *agr* کد می‌شوند و دیگری پروتئین فعال کننده RNA III هدف TRAP که در خارج از این لوکوس کد می‌شود(۶). سیستم *agr* یک سیستم حد نصاب احساس است که در طی فاز ساکن رشد انتقال میابد و با افزایش بیان ژن باعث رونویسی از توکسین‌های خارج سلولی می‌شود(۷). لوکوس *agr* شامل دو واحد رونویسی مختلف است که تحت کنترل پروموتور P2(RNAII) و P3(RNAIII) می‌باشد. اپرون P2 سیستم انتقال پیام شامل *agrC* (هیستیدین کیناز رسپتور غشایی) و *agrA* (تنظیم کننده سیتوپلاسمیک)، *agrD* (پروپپتید) و *agrB* (پروتئین تلفیق غشایی) را کد می‌کند که توانایی پردازش و یا ترشح پپتید را دارد(۷).

بسیاری از فاکتورهای ویرولانس در استافیلوکوک اورئوس تابع ژن‌های تنظیم کننده*agr* و *sar* می‌باشد. این تنظیم در رشد محیطی استافیلوکوک ارئوس موثر است. ژن *sar* باعث چسبندگی بهتر استافیلوکوک اورئوس به سطوح شیشه می‌شود و ژن *agr* نسبت به ژن *sar* کمتر باعث چسبندگی به سطوح شیشه‌ای می‌شود(۸) و هم‌چنین فعالیت ژن *agr* منجر به افزایش نسخه برداری ژن دلتا لیزین *hld* (از فاکتورهای ویرولانس استافیلوکوک اورئوس) می‌گردد که توسط ژن *agr* تنظیم می‌شود(۹). سیستم *agr* تولید محصولات خارج سلولی از جمله همولیزین، کواگولاز و پروتئین A را نیز کنترل می‌کند که در ویرولانس باکتری دارای نقش بسیار زیادی می‌باشند(۹). در استافیلوکوک اروئوس تنظیم فاکتورهای ویرولانس و ژن‌های دیگر از جمله اگزوپروتئین توسط سیستم‌های تنظیمی *agr* ، *xpr* و (تنظیم کننده پروتئین خارج سلولی) *sar* انجام می‌گیرد که در فاز لگاریتمی یا فاز رشد تصاعدی اتفاق می‌افتد(۱۰). به طور کلی، سیستم *agr* در واقع یک سیستم حد نصاب احساس است که طی عبور از فاز رشد تصاعدی به فاز سکون به وسیله یک سیستم خود تنظیم که شامل تغییر شکل پپتید فرومون می‌باشد فعال می‌شود که در واقع سیگنال‌هایی را در حالت تراکم سلولی انتقال می‌دهد(۱۱). فرومون اکتا پپتیدی است که از قطعه داخلی سکانس کد کننده *agrD* مشتق می‌شود و فرومون از پاسخ به سیستم *agr* جلوگیری می‌کند(۱۲). از آن‌جایی که فرومون‌های *agr* یک زیر گروه از اثر *agr* سایر گروه‌ها جوگیری می‌کند، از این رو، از فرومون‌ها برای درمان عفونت‌های استافیلوکوک اورئوس استفاده می‌شود(۱۲). هدف از این مطالعه، تعیین فراوانی ژن‌های *agr* در استافیلوکوک اورئوس‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین ایزوله شده از نمونه‌های کلینیکی و ناقلین شاغل در مراکز درمانی با روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) می‌باشد.

مواد و روش ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: این پژوهش توصیفی بر روی ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به

www.SID.ir

Archive of SID

متی‌سیلین به دست آمده از نمونه‌های بالینی بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر همدان طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ انجام گرفت. جدول ۱ توزیع فراوانی سویه‌های استافیلوکوک را بر حسب نوع نمونه بالینی نشان می‌دهد.

جداسازی و شناسایی سویه‌ها: شناسایی جنس استافیلوکوک بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، واکنش کاتالاز، تخمیر مانیتول، تست‌های بیوشیمیایی(کاتالاز مثبت، کواگولاز و DNase) و انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. در مرحله بعد، تایید گونه‌های استافیلوکوک اورئوس با هدف ژن *Nuc* اختصاصی استافیلوکوک اورئوس با توالی پرایمرهای موجود در جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱. توزیع فراوانی سویه‌های استافیلوکوک بر حسب نوع نمونه بالینی

نوع نمونه	MRSA (درصد)	MSSA (درصد)	مجموع(درصد)
خون	۴۰(۴۰)	۱۸(۱۸)	۵۸(۲۹)
مجرای تراکئال	۱۹(۱۹)	۹(۹)	۲۸(۱۴)
زخم	۱۵(۱۵)	۶(۶)	۲۱(۱۰/۵)
ادرار	۲۱(۲۱)	۱۱(۱۱)	۳۲(۱۶)
چرک	۳(۳)	۱(۱)	۴(۲)
سواپ گلو	۲(۲)	۵(۵)	۷(۳/۵)
سواپ بینی	۰	۵۰(۵۰)	۵۰(۲۵)
مجموع	۱۰۰(۱۰۰)	۱۰۰(۱۰۰)	۲۰۰(۱۰۰)

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن هدف	توالی	محصول (bp)	Nlhd Hkdgdk' (°C)	مرجع
agrA	F: ATGCACATGGTGCACATGC R: GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	439	55	(۱۳)
agrB	F: TATTACTAATTGAAAAG R: TGCCATAGC	572	55	(۱۳)
agrC	F: GTAATGTAATAGCTTGTA R: TAATAATACCCAG	320	55	(۱۳)
agrD	F: CGATAATGCCGTAATACCCG R: CGATAATGCCGTAATACCCG	657	55	(۱۳)
mecA	F: CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA R: GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310	60	(۱۴)
nuc	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R:AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279	55	(۱۵)

آزمون Multiplex PCR جهت ردیابی ژن‌های *agr*

چرخه‌ی دمایی و غلظت مواد استفاده شده برای PCR با هدف *ژن agr* در جدول ۳ آورده شده است.

استخراج DNA: استخراج DNA تمامی سویه‌ها به کمک لیزوزیم و کیت مناسب (BioFlux، ساخت ژاپن) انجام شد.

واکنش PCR ژن‌های مورد نظر *nuc*، *mecA* و *agr* با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بر طبق جدول ۳ با استفاده از دستگاه ترموسایکلر eppendorf و Biorad انجام گرفت. شرایط بهینه PCR در جدول ۳ ذکر گردیده است. از ژل آگارز ۱ درصد و سایز مارکر bp ۱۰۰ (شرکت فرمنتاس، آلمان) و سایبر سیف (شرکت سیناژن، ایران) برای الکتروفورز محصولات PCR استفاده شد. در این مطالعه از آب دوبار تقطیر به جای DNA سویه کنترل منفی استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. چرخه‌ی دمایی و غلظت مواد استفاده شده برای PCR با هدف ژن*agr*

نام مواد یا محلول	حجم	چرخه ی دمایی برای تکثیر
2X Taq Premix Mastermix	12.5µl	Cycle 1 : 94°C , 5 min
پرایمر پیش رو agrA, B, C, D (۱۰ پیکومتر)	4 µl	Cycle 2 : 94°C , 30 sec
		Cycle 3 : 55°C , 55 sec
پرایمر پس رو agrA, B, C, D (۱۰ پیکومتر)	4 µl	Cycle 4 : 72°C , 60 sec
الگوی DNA	3 µl	Cycle 5 : Go 2 to 4 35 times
آب مقطر استریل	1.5 µl	Cycle 6 : 72°C , 10 min
حجم کلی	25 µl	

تعیین حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی: تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۱۰۰ سویه MRSA و ۱۰۰ سویه MSSA با تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت ۵ درصد مک فارلند به روش انتشار دیسک و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در محیط آگار Muller Hinton انجام شد. دیسک‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، تیکوپلانین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین(۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کلینداماسین (۲ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، ریفاماسین (۵ میکروگرم) و جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت ماست انگلستان می‌باشند. جهت کنترل کیفی دیسک‌ها و محیط کشت مولرهینتون از سویه کنترلی ATCC 25423 استفاده شد. هاله‌های عدم رشد با جدول CLSI مطابقت داده شدند. نتایج به‌دست آمده از آنتی‌بیوگرام سویه‌ها بر طبق دستورالعمل CLSI مطابق جدول ۴ می‌باشد(۱۶).

جدول ۴. فراوانی سویه‌های جدا شده در بیمارستان‌های مختلف

	MRSA (درصد)	MSSA (درصد)	ناقلین (درصد)
بیمارستان بهشتی	۴۲(۴۲)	۱۵(۳۰)	۱۳(۲۶)
بیمارستان سینا	۲۳(۲۳)	۱۳(۲۶)	۱۰(۲۰)
بیمارستان بعثت	۳۰(۳۰)	۲۰(۴۰)	۱۸(۳۶)
بیمارستان فاطمیه	۵(۵)	۴(۴)	۵(۱۰)
دانشجویان پزشکی	–	–	۴(۸)
مجموع	۱۰۰(۱۰۰)	۵۰(۱۰۰)	۵۰(۱۰۰)

تعیین مقاومت نسبت به متی‌سیلین با روش دیسک دیفیوژن

بدین منظور بر طبق پروتکل CLSI، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند از کشت ۲۴ ساعته و تازه باکتری، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه شد و با استفاده از سواپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار(مشخصات محیط) به صورت یکنواخت تلقیح شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، دیسک‌های سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم، شرکت ماست) با استفاده از یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس قطر هاله‌های عدم رشد بررسی گردید. قطر هاله ۲۲ یا کمتر به عنوان حساس به متی‌سیلین و بیشتر یا مساوی ۲۱ به عنوان مقاوم گزارش شد. از سویه‌ی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی و از سویه‌ی ATCC 25423 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید(۱۷).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: ارتباط بین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. معنی‌داری تست دوجهتی بوده و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان استفاده گردید. این سویه‌ها از بیمارستان‌های آموزشی شهر همدان جمع‌آوری شده بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

از این تعداد، ۱۰۰ سویه مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، ۵۰ سویه حساس به متی‌سیلین (MSSA) و ۵۰ سویه حساس به متی‌سیلین جدا شده از ناقلین بوده که اطلاعات مربوط به این سویه ها در جدول ۵ توضیح داده شده است.

جدول ۵. مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین دو گروه حساس و مقاوم به متی‌سیلین

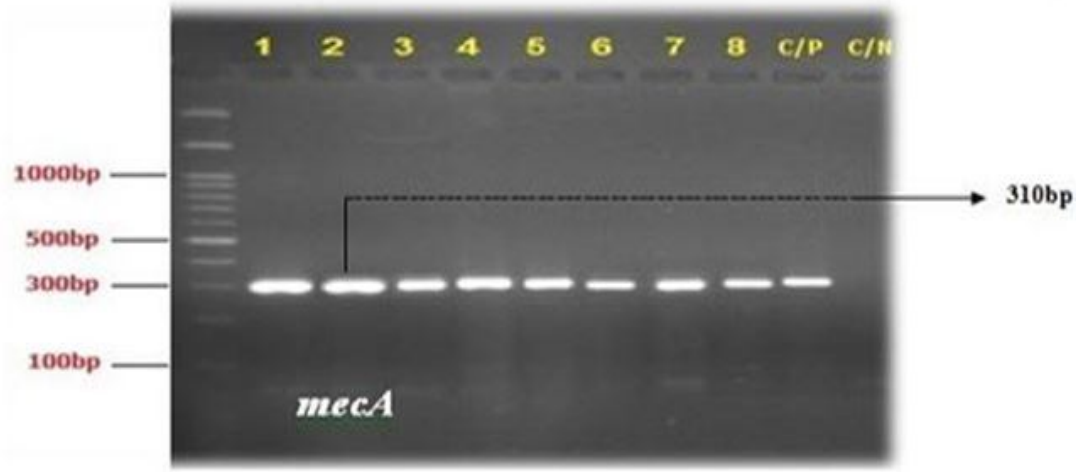
آنتی بیوتیک	درصد فراوانی مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس		p
	MSSA (n=100) (درصد)	MRSA (n=100) (درصد)	
ریفامپین	۲۴	۸۴	<۰/۰۰۱
جنتامایسین	۱۲	۹۰	<۰/۰۰۱
تتراسایکلین	۲۰	۹۲	<۰/۰۰۱
کوتریموکسازول	۷۲	۸۴	=۰/۰۸۳
سیپروفلوکساسین	۶۴	۹۶	<۰/۰۰۱
کلیندامایسین	۳۴	۸۲	<۰/۰۰۱
اریترومایسین	۹۰	۹۲	=۰/۶۸۱

نتایج حاصل از تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک

از ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مورد آزمایش، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب به سیپروفلوکساسین ۹۶ (۹۶ درصد)، تتراسایکلین و اریترومایسین ۹۲(۹۲ درصد)، جنتامایسین ۹۰(۹۰ درصد)، ریفامپین و کوتریموکسازول ۸۴(۸۴ درصد) و کلیندامایسین ۸۲ (۸۲ درصد) مربوط می‌باشد. تمامی سویه‌ها به ونکومایسین حساس بودند.

نتایج PCR مربوط به ژن *mecA*

بعد از جدا کردن سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بر طبق روش دیسک دیفیوژن، سویه‌هایی که به سفوکستین مقاوم بودند با پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA* مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج آن مشابه آنتی بیوگرام بود و تمام ۱۰۰ (۵۰ درصد) سویه مقاوم به متی‌سیلین دارای این ژن بودند. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. الکتروفورز محصول ژن mec A در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس . ردیف‌های شماره ۱ تا ۸: سویه‌های دارای ژن mecA با محصول ۳۱۰ جفت باز، ردیف شماره ۹ : کنترل مثبت سویه ATCC 25923، ردیف شماره ۱۰: کنترل منفی، (M : مارکر 100 bp شرکت فرمنتاس).

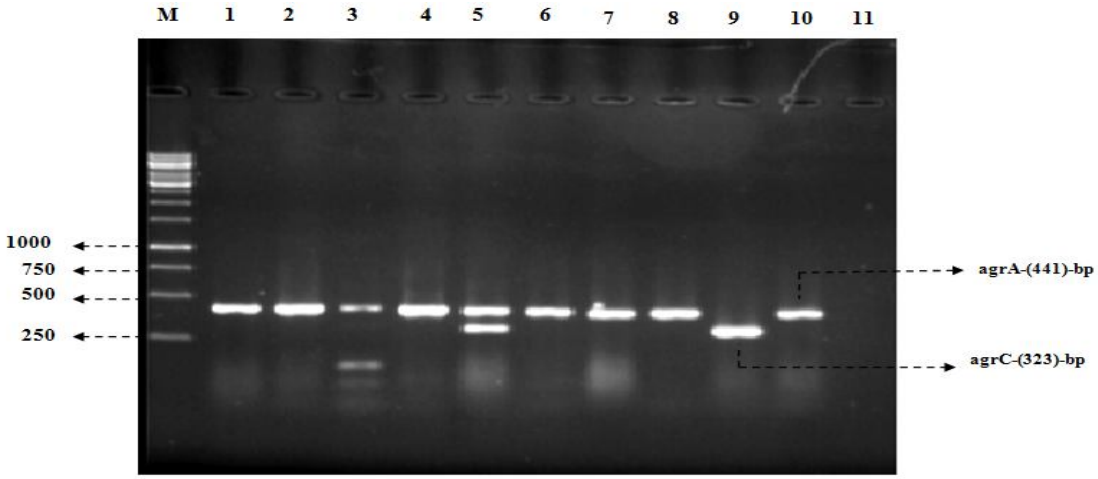
نتایج PCR ژن‌های *agrA,B,C,D* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس

با توجه به نتایج به دست آمده از واکنش PCR، بیشترین فراوانی ژن‌های *agr* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به ترتیب به *agrA* ۶۸ (۶۸ درصد) و *agrC* ۲۶(۲۶ درصد) مربوط می‌باشد. در سویه‌های حساس به متی‌سیلین بیشترین فراوانی به *agrA* با ۳۰ سویه (۶۰ درصد) و بعد از آن به *agrC* با ۱۵ سویه (۳۰

www.SID.ir

Archive of SID

درصد) مربوط می‌باشد و در سویه‌های جدا شده از هم *agrA* با ۳۲ سویه (۶۴ درصد) بیشترین فراوانی و *agrC* با ۱۳ سویه (۲۶ درصد) کمترین فراوانی را داشتند. *AgrB* و *agrD* در هیچ کدام از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشد(شکل ۲).



شکل ۲. ژل الکتروفورز برای محصول PCR ژن‌های agr،ستون ۱ تا ۴: ژن agrA (bp-۴۴۱)، ستون ۵: ژنagrA و agrC (bp-۴۴۱وbp -۳۲۳)، ستون۶ تا ۸: ژن agrA (bp-۴۴۱) ستون ۹: ژن agrC (bp-۳۲۳)، ستون ۱۰: ژن agrA (bp-۴۴۱)،ستون ۱۱: کنترل منفی (نمونه بدون DNA) (M : مارکر bp 100 شرکت فرمنتاس).

تحلیل آماری با مقایسه نتایج میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر بین سویه‌های حساس به متی‌سیلین و مقاوم به متی‌سیلین و با توجه به بررسی‌های آماری مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله تتراسایکلین، جنتامایسین، سیپروفلوکسلسین، کلیندامایسین و ریفامپین وجود دارد(p<۰/۰۵).

بحث

استافیلوکوک‌ها به ویژه گونه اورئوس، پاتوژن‌های بسیار قوی هستند و یکی از عمده‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهند. عفونت استافیلوکوکی هر ارگان یا سیستمی از بدن را می‌تواند درگیر کند. قابلیت استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت‌زایی با این طیف وسیع به علت دارا بودن فاکتورهای متعدد ویرولانس است وافزایش مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و انتشار روزافزون سویه‌های مقاوم مزید بر علت شده است(۱۸، ۱۹). با مقایسه نتایج میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر بین سویه‌های حساس به متی‌سیلین و مقاوم به متی‌سیلین و بررسی‌های آماری مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله تتراسایکلین، جنتامایسن، سیپروفلوکسلسین، کلیندامایسین و ریفامپین وجود دارد(p<۰/۰۵). این یافته با مطالعه دی جینگ وو و همکاران مطابقت دارد(۲۰). با این که مقاومت به کوتریموکسازول و اریترومایسین در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین بالاتر از سویه‌های حساس به متی‌سیلین می‌باشد، اما از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد(p>۰/۰۵).

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه *agrA* بیشترین فراوانی را در بین تیپ‌های مختلف داشت. از ۱۰۰ سویه MRSA، ۶۸ درصد سویه‌ها دارای این تیپ و از ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ناقلان، ۶۴ درصد سویه‌ها دارای این تیپ بودند. در ۵۰ سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین، ۶۰ درصد دارای ژن *agrA* بودند. این نتایج با یافته‌های نجار پیرایه و همکاران که فراوانی ژن *agrA* را ۵۵/۱ درصد عنوان کردند

www.SID.ir

Archive of SID

و نیز با یافته‌های و حسن نژاد و همکاران در شهر گرگان که فراوانی *agrA* را ۴۳/۳ درصد گزارش کردند مشابهت دارد(۲۱، ۲۲). این مشابهت نتایج نشان دهنده نزدیکی ژنتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در داخل کشور می‌باشد. در پژوهشی که توسط ایندراواتانا و همکاران در کشور تایلند انجام شد، بیشترین فراوانی ژن‌های *agr* مربوط به *agrA* با فراوانی ۵۸/۷ درصد بوده است که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت(۲۳). اما در مطالعه‌ی شاپسین و همکاران در آمریکا فراوانی *agrA* ۳۰/۸ درصد و همین‌طور در مطالعه بن آید و همکاران در کشور تونس فراوانی agrA ۱۵ درصد گزارش شد که با نتایج این مطالعه مغایرت دارد(۲۴، ۲۵). با توجه به تحلیل‌های آماری هیچ ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به متی‌سیلین و فراوانی ژن‌های *agr* در این مطالعه وجود نداشت($p>0/05$). فراوانی ژن *agrC* در این مطالعه برابر با ۲۶ درصد در ۱۰۰ سویه MRSA، ۳۰ درصد در ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین و ۲۶ درصد در ۵۰ سویه ناقلان می‌باشد. این یافته در مطالعه حاضر با مطالعه‌های دیگر از جمله مطالعه حسن نژاد، شاپسین و نجار پیرایه هم‌خوانی دارد. در مطالعه حاضر، هیچ کدام از سویه‌ها ژن‌های *agrB* و *agrD* را نداشتند که این یافته با نتایج دیگر مطالعات مغایرت دارد. ژن‌های *agr* می‌توانند با بیماری‌ها و فاکتورهای ویرولانس مرتبط با استافیلوکوکوس اورئوس در ارتباط باشند. جارائودس و همکاران در مطالعه خود در امریکا نشان دادند که ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مولد سندروم شوک توکسیک متعلق به *agrC* هستند و سویه‌های مولد سندروم فلسی شدن پوست متعلق به *agr* group IV می‌باشد(۲۶، ۲۷). هم‌چنین راسموسن و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که ایزوله‌های متعلق به *agrA* عامل عفونت‌های تهاجمی به خصوص باکتریمی و عامل عفونت‌های غیر تهاجمی *agrC* هستند. هم‌چنین مشخص گردید که *agrB* اغلب از بیماری‌های مهاجم و *agrC* از نمونه‌های حاملان جدا می‌شود(۲۸).

نتیجه گیری

با توجه به این که سیستم‌های حدنصاب احساس در استافیلوکوک شناسایی شده‌اند و یکی از عمده‌ترین این سیستم‌ها، سیستم *agr* می‌باشد که باعث بیان ژن‌های متنوع ویرولانس، ژن‌های متابولیسمی، ژن‌های اسپورولاسیون و سایر ژن‌های مورد نیاز برای بقای باکتری می‌شود، از این رو با قطع عمل ترانسداکشنال سیگنال‌ها می‌توان از بروز این ژن‌های ویرولانس کاست. این مسئله می‌تواند به این صورت تحقق یابد که با استفاده از مواد طبیعی مثل استفاده از عصاره سیر و دیگر ترکیبات طبیعی یا استفاده از ترکیبات شیمیایی مانند سولونامید B می‌توان از حد نصاب احساس جلوگیری کرد. بنابر این سیستم *agr* به عنوان یک هدف دارویی مطرح است که با تشخیص به موقع و سریع *agr* و نوع آن می‌توان به درمان سریع با مواد ضد حد نصاب احساس کمک کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر فراهم نمودن دستگاه‌های مورد نیاز و همکاری صمیمانه در حین انجام کارهای عملی تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. Clinical infectious diseases. 2008; 46(Supplement 5):S350-S9.
2. Yancey RJ. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. Advances in veterinary medicine. 1999; 41: 257-73.
3. Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. Annual review of genetics. 2008; 42: 541-64.
4. Batzilla CF, Rachid S, Engelmann S, Hecker M, Hacker J, Ziebuhr W. Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, codY expression and

www.SID.ir

Archive of SID

amino acid metabolism in Staphylococcus epidermidis. Proteomics. 2006; 6(12):3602-13.
5. Cheung GY, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE, Otto M. Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus pathogenesis. Infection and immunity. 2011; 79(5):1927-35.
6. Balaban N, Goldkorn T, Gov Y, Hirshberg M, Koyfman N, Matthews HR, et al. Regulation of Staphylococcus aureus pathogenesis via target of RNAIII-activating protein (TRAP). Journal of Biological Chemistry. 2001; 276(4):2658-67.
7. Murray EJ, Crowley RC, Truman A, Clarke SR, Cottam JA, Jadhav GP, et al. Targeting Staphylococcus aureus quorum sensing with nonpeptidic small molecule inhibitors. Journal of medicinal chemistry. 2014; 57(6):2813-9.
8. Pratten J, Foster SJ, Chan PF, Wilson M, Nair SP. Staphylococcus aureus accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. Microbes and infection. 2001;3(8):633-7.
9. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates. Microbiology. 2008; 154(8):2265-74.
10. Cheung AL, Koomey JM, Butler CA, Projan SJ, Fischetti VA. Regulation of exoprotein expression in Staphylococcus aureus by a locus (sar) distinct from agr. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992; 89(14):6462-6.
11. Fournier B. Global regulators of Staphylococcus aureus virulence genes. Staphylococcus molecular genetics. 2008.p.131-83.
12. Otto M, Süßmuth R, Vuong C, Jung G, Götz F. Inhibition of virulence factor expression in Staphylococcus aureus by the Staphylococcus epidermidis agr pheromone and derivatives. FEBS letters. 1999;450(3):257-62.
13. Zhang LH, Dong YH. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. Molecular microbiology. 2004; 53(6):1563-71.
14. Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Maino L, Kayser FH, et al. Sequence comparison of mecA genes isolated from methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Gene. 1990;94(1):137-8.
15. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from coagulase-negative staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(11):4947-55.
16. D'Souza N, Shetty A, Mehta A, Rodrigues C. Antimicrobial susceptibility profiles of meticillin-susceptible and-resistant Staphylococcus aureus: focus on daptomycin minimum inhibitory concentrations at a tertiary care centre in Mumbai, India. International journal of antimicrobial agents. 2010; 36(3): 267-70.
17. Kim HB, Jang H-C, Nam HJ, Lee YS, Kim BS, Park WB, et al. In vitro activities of 28 antimicrobial agents against Staphylococcus aureus isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(4):1124-7.
18. Mullarky I, Su C, Frieze N, Park Y, Sordillo L. Staphylococcus aureus agr genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. Infection and immunity. 2001; 69(1):45-51.
19. Gross-Schulman S, Dassey D, Mascola L, Anaya C. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Jama. 1998;280(5):421-2.
20. Wu D, Li X, Yang Y, Zheng Y, Wang C, Deng L, et al. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from Chinese children. Journal of medical microbiology. 2011; 60(1):35-45.
21. Peerayeh SN, Azimian A, Nejad QB, Kashi M. Prevalence of agr specificity groups among Staphylococcus aureus isolates from university hospitals in Tehran. Lab Medicine. 2009; 40(1):27-9.
22. Ghaemi EA. The relation between accessory gene regulator (agr) types of S. aureus and some phenotypic criteria. Arak Medical University Journal. 2014; 17(6):1-8.
23. Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsa-Nguan M, Tungtrongchitr A,

www.SID.ir

Archive of SID

Voravuthikunchai S, et al. Staphylococcus aureus clinical isolates: antibiotic susceptibility, molecular characteristics, and ability to form biofilm. BioMed research international. 2013; 2013.
24. Ayed SB, Boubaker IB-B, Samir E, Redjeb SB. Prevalence of agr specificity groups among methicilin resistant Staphylococcus aureus circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. Pathologie Biologie. 2006; 54(8):435-8.
25. 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. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41(1):456-9.
26. Jarraud S, Lyon G, Figueiredo A, Lina G, Vandenesch F, Etienne J, et al. Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in Staphylococcus aureus. Journal of bacteriology. 2011; 193(24): 7027-8.
27. 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. Infection and immunity. 2002; 70(2):631-41.
28. Rasmussen G, Monecke S, Ehricht R, Söderquist B. Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive Staphylococcus aureus isolates in Sweden. PLoS One. 2013; 8(10): e77477-8.

www.SID.ir