جداسازی همزمان ژن های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک روی پلاسیمد کد کننده اگزوفولیاتیو B با روش Multiplex-PCRدر نمونه های پوستی آلوده به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

الهام سیاسی *[۱]، زیبا سادات مجیدی سید بیگلو[۲]، فرزانه حسینی[۳]

۱- گروه میکروبیولوژی- دانشکده علوم زیستی- دانشگاه آزاد اسلامی – واحد تهران شمال – تهران – ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی- دانشکده علوم زیستی- دانشگاه آزاد اسلامی – واحد تهران شمال – تهران – ایران.
۳-گروه میکروبیولوژی- دانشکده علوم زیستی- دانشگاه آزاد اسلامی – واحد تهران شمال – تهران – ایران.

***نشانی برای مکاتبه:** میدان هروی – خیابان مکران جنوبی – بوستان دهم – دانشکده علوم زیستی - گروه میکروبیولوژی (هیئت علمی تمام وقت). تلفن : ۰۹۱۲۴۰۵۶۷۴۶- نمابر : ۰۲۱۲۲۹۲۴۸۳۳ - emi_biotech2006@yahoo.ca

دریافت مقاله: اردیبهشت نود و هفت پذیرش برای چاپ: تیر نود و هفت

چکیده

سابقه و هدف *: اگزفولیاتیو از فاکتورهای مختلفی است که استافیلوکوکوس اورئوس برای کلونیزه شدن و ایجاد بیماری تولید می کند. هدف این مطالعه بررسی حضور ژن های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک روی پلاسیمد کد کننده اگزوفولیاتیو B در نمونه های پوستی آلوده به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود.*

روش کار: *۱۰۰ نمونه زخم از بیمارستان های تهران جمع آوری گردید. باکتری ها با استفاده از تست های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی شناسایی شدند. در نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس تست انتی بیوگرام انجام گردید . سپس DNA باکتری های مقاوم استخراج شد. با انجام Multiplex- PCR حضور ژن های etb ، aac ، msrA مقاوم به چندین آنتی بیوتیک بررسی گردید .*

یافته ها *: از ۱۰۰ نمونه زخم تعداد ۶۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جمع آوری شد. میزان مقاومت به اریترومایسین ، جنتامایسین ، توبرامایسین ، سیپروفلوکساسین و لینزولید به ترتیب برابر ۳ (۵٪) ، ۱(۲٪) ، ۱(۲٪) ، ۱(۲٪) و۰(۰٪) بود . فراوانی ژن های msrA ، aac و etb به ترتیب برابر ۲۹(۴۸/۳٪) ، ۴۵(۷۵٪) و۳۷(۶۱/۷٪) بود . هم چنین، فراوانی به طور همزمان برای ژن های etb/aac ، etb/msrA ، msrA/aac و msrA/aac/etb تعداد ۲۸ (۴۶/۶٪) ، ۲۲ (۳۶/۶٪) ، ۲۲ (۳۶/۶٪) و ۱۸ (۳۰٪) سویه بود.*

نتیجه گیری *: در این مطالعه حضور ژن etb در بیشتر سویه ها مشخص شد. همچنین جستجوی همزمان ژن های ویرولانس در استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از زخم های پوستی نشان داد فراوانی ژن های بیماریزای مقاوم به دارو در بین سویه ها در حال افزایش است.*

واژگان کلیدی: ژن های مقاوم پلاسمیدی، اگزوفولیاتیو B، استافیلوکوکوس اورئوس، زخم پوستی، Multiplex-PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس ها شایع ترین عامل عفونت چرکی موضعی، عفونت‌های شدید و کشنده به صورت پنومونی، سپتی سمی، آندوکاردیت و آبسه‌های مغز و سایر اعضاء داخلی، عفونت‌های استخوانی (استئومیلیت) هستند. به طور کلی اکثر عفونت‌های خطرناک استافیلوکوکی از بیمارستان‌ها سرچشمه می‌گیرند و امروزه عامل ۲۰٪ از عفونت های بیمارستانی هستند(۱، ۲) . عفونت های استافیلوکوکی پوست، شایع ترین عفونت های باکتریایی در انسان است. از این عفونت ها می توان به دمل، کورک، کفکیرک، زرده زخم، سندرم فلسی شدن اپیدرم (سندرم پوست سوخته) که به سه صورت مشاهده می گردد (درماتیت اکسفولیاتیو منتشره، زرد زخم تاولی، تب مخملکی استافیلوکوکی) اشاره نمود(۳، ۴).

ژنوم *استافیلوکوکوس اورئوس* از یک کروموزوم حلقوی به طول ۲/۸ میلیون جفت باز و تعدادی ترانسپوزون و عناصر الحاقی و پلاسمید و باکتریوفاژ تشکیل شده که در مقاومت آنتی بیوتیکی و بیماری زایی باکتری نقش دارند و می توانند بین سویه های مختلف منتقل شوند(۵). *استافیلوکوکوس اورئوس* توکسین های متنوعی تولید می کند که بر اساس عملکردشان به گروه های مختلفی تقسیم می شوند بعضی خاصیت سیتوتوکسیک دارند مثل همولیزین ها، گروهی تب زا و بعضی انتروتوکسین هستند. اگزفولیاتیو توکسین از گروه توکسین های تب زا می باشد که سندرم فلسی شدن پوست استافیلوکوکی (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome-SSSS) را ایجاد می نماید و موجب پوسته پوسته

شدن اپیدرم می شود. عامل اصلی این بیماری سم اگزوفولیاتیو حاصل از *استافیلوکوکوس اورئوس* است . سم از دو جز A و B تشکیل شده است . ژن مربوط به جز A (*eta*) بر روی کروموزوم و ژن مربوط به جز B (*etb*) بر روی پلاسمید قرار دارد (۲، ۶) .

این باکتری با مکانیسم های متفاوت به انتی بیوتیک ها مقاوم شده است از جمله، مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام که به دلیل کسب پلاسمید کد کننده آنزیم پنی سیلیناز می باشد، مقاومت به انتی بیوتیک های(MLS) Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B ، که در این صورت آنتی بیوتیک های MLS با اتصال به زیر واحد ۵۰s ریبوزوم از سنتز پروتئین جلوگیری می کنند، مقاومت در اثر تغییر در سایت هدف دارو ، تغییر خود دارو و کاهش تجمع داخل سلولی دارو می تواند روی دهد، همچنین شایع ترین مکانیسم مقاومت تغییر ریبوزومی و ترشح دارو به خارج سلول می باشد (۷، ۸). برخی از سویه های استافیلوکوکوس حاوی ژن *msrA* می باشند که مقاومت به ماکرولیدها و استرپتوگرامین B را کد می کند. ژن *msrA* بر روی پلاسمید قرار داشته و اغلب در سویه های کواگولاز منفی استافیلوکوکوس مقاوم به آنتی بیوتیک های MLS دیده می شود و می تواند به سایر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز منتقل شود. در صورت مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، آمینوکلیکوزیدها با اتصال به 16srRNA در زیر واحد ۳۰s ریبوزوم مانع سنتز پروتئین در باکتری ها می شود. مقاومت از طریق ۳ مکانیسم نسبت به این انتی بیوتیک ها صورت می گیرد . جهش در ژن های کروموزومی که منجر به تغییر سایت هدف دارو می شود، تخریب آنزیمی دارو (توسط ژن های پلاسمیدی) و عدم نفوذ دارو به سلول باکتری ، که ممکن است کروموزومی باشد و یا پلاسمیدی (۹، ۱۰) . ژن *aac* ژن مقاومت به امینوگلیکوزید ها می باشد که با مکانیسم انتقال آمینوگلیکوزیدها و فعالیت استیل ترانسفرازی سبب افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای این ژن می گردد.

هدف اصلی این تحقیق بررسی حضور هم زمان ژن های مقاومت به چندین آنتی بیوتیک بر روی پلاسمید کد کننده اگزفولیاتیو B در نمونه های پوستی آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش Multiplex-PCR بود. در میکروب شناسی بالینی، با استفاده از این روش امکان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه به طور هم زمان وجود دارد، زیرا با استفاده از چند پرایمر در یک محلول PCR ، آمپلیکون هایی تهیه می شود که اندازه های متفاوتی دارند و مختص DNA های مختلف هستند و با هدف قرار دادن چندین ژن در یک محلول PCR ، می توان اطلاعات بیش تری را بررسی نمود.

روش کار

در ابتدا تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی از نمونه های زخم بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهر تهران جمع آوری شد و در محیط نگهدارنده به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها بعداز جمع آوری و انتقال به آزمایشگاه در محیط های جامد آگار خوندار ، آگار شکلاتی و مک کانکی آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت ، پلیت ها بررسی شدند . اگر در هر سه محیط ، باکتری رشد نموده بود دلیل برگرم منفی بودن باکتری در نظر گرفته شد . در صورت عدم رشد باکتری در محیط های کشت ویژه گرم منفی ها ، مانند مک کانکی آگار ، گرم مثبت بودن باکتری گزارش شد . از کلنی های مجزا و مشخص رشد کرده در محیط بلاد آگار ، لام رنگ آمیزی گرم تهیه نموده پس از مشاهده ویژگی های شکلی باکتری ها در زیرمیکروسکوپ ، کوکسی های گرم مثبت جدا شدند. جهت تمایز استافیلوکوکوس ها از استرپتو کوکوس های گرم مثبت ، از تست کاتالاز و اکسیداز استفاده شد تا استافیلوکوکوس های کاتالاز مثبت و استرپتوکوکوس های کاتالاز منفی جداگردند . جهت تمایز گونه های استافیلوکوکوس ها از یک دیگر ، از تست های کوآگولاز لوله ای، تست DNase ، رشد در محیط مانیتول سالت آگار (MSA) ، حساسیت به باسیتراسین و مقاومت نسبت به دیسک نووبیوسین و تست های تخمیری (مالتوز ، ترهالوز ، مانوز ، گزیلوز ، ساکاروز) استفاده شد و جهت تمایز استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت از استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی، از تست همولیز بتا در محیط بلاد آگار، استفاده شد.

جهت سنجش حساسیت نسبت به انتی بیوتیک ها تست انتی بیوگرام انجام شد و دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده ازروش کربی بائر و طبق دستورالعمل استاندارد CLSI پس از تهیه ی سوسپانسیونی از باکتری معادل غلظت نیم مک فارلند وکشت متراکم برروی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. سپس دیسک های آنتی بیوتیکی شامل اریترومایسین ۱۵میکروگرم ، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم ، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم ، توبرامایسین ۳۰ میکروگرم و لینزولید ۳۰ میکروگرم ، با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفت و محیط کشت به مدت ۱۸- ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شد . بعداز آن قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش اندازه گرفته شد و با استانداردهای جهانی (CLSI) مقایسه گردید و به صورت مقاوم (R) Resistant ، نیمه حساس (I) Intermediate، و حساس(S) Sensitive گزارش شد.

کلنی خالص *استافیلوکوکوس اورئوس* های شناسایی شده در محیط مایع BHI کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری های گرم مثبت، استخراج ژنوم از این باکتری ها انجام گرفت.

جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (USA THERMO ,) و نسبت میزان جذب A260/A280 بر حسب ماکروگرم DNA بر یک میلی لیتر استفاده گردید . هم چنین جهت ارزیابی DNA سلولی استخراج شده از نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱٪ ، الکتروفورز انجام گرفت.

برای شناسایی وجود سه ژن مقاوم شامل ؛ *etb* ، *aac* و *msrA* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد آزمایش ، از تکنیک PCR Multiplex- استفاده شد . واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت.. توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده و حجم مواد مورد نیاز و برنامه دستگاه PCR ، به ترتیب در جداول۱ و ۲ و ۳ آمده است .

جدول۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در Multiplex- PCR

نام ژن	توالی اولیگونوکلئوتیدی(′۳→′۵)	طول قطعه مورد نظر(bp)
etb	F- 5′ ATACACACATTACGGATAAT 3′ R- 5′ CAAAGTGTCTCCAAAAGT 3′	۵۲۹
aac	F- 5' TACAGAGCCTTGGGAAGATG 3 ' R- 5' CATTTGTGGCATTATCATCATATC 3′	۴۰۶
msrA	F- 5′ TGCAAATGGCATACTATCGTC 3′ R- 5′ CAAGAACGCTCAAGTGCTTC 3′	۱۶۰

جدول ۲- موادلازم برای انجام واکنش PCR

مواد مورد نیاز	حجم مورد نظر
dNTP	**۱ میکرولیتر**
PCR buffer	**۲/۵ میکرولیتر**
Mgcl2	**۱ میکرولیتر**
PCR water	**۱۳ میکرولیتر**
Primer F	**(۳ مورد به ازای ۳ ژن) ۱میکرولیتر**
Primer R	**(۳ مورد به ازای ۳ ژن) ۱ میکرولیتر**
TaqDNAPolymerase	**۰/۵ میکرولیتر**
DNAtemplate	**۱ میکرولیتر**
حجم نهایی	**۲۵ میکرولیتر**

جدول ۳- سیکل زمانی و دمایی مربوط به دستگاه ترمو سایکلر برای ژن های *etb/aac/msrA*

ردیف	مرحله واکنش	دما(درجه سلسیوس)	زمان
۱	PrimaryDenaturation	۹۴	۴دقیقه
۲	Denaturation	۹۴	۵۰ثانیه
۳	Annealing	۵۶	۳۰ثانیه
۴	Extention	۷۲	۲دقیقه
۵	Final Extention	۷۲	۱۰دقیقه

*این برنامه حدود ۳۵ سیکل تکرار می شود.

پس از انجام واکنش پلیمراز محصول Multiplex- PCR روی ژل اگاروز برده شد. سپس رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. برای رنگ آمیزی ژل ، ژل را ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در محلول حاوی ژل رد قرار داده و بعد توسط دستگاه Gel Doc باندهای DNA مشاهده شدند. از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 و ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت و از انتروکوکوس فکالیس ATCC 51299 به عنوان کنترل منفی استفاده شد .

پس از جمع آوری نتایج، داده ها به وسیله ی نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها

از تعداد۱۰۰ نمونه زخم، ۶۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شد.باکتری استافیلوکوکوس اورئوس گرم مثبت می باشد که به صورت منفرد، جفت، چهارتایی، زنجیره های کوتاه و توده های نا منظم شبیه خوشه انگور و به رنگ بنفش زیر میکروسکپ مشاهده شدند. سویه ها روی محیط کشت بلاد آگار رشد و کلنی های طلایی با همولیز بتا ایجاد نمودند. استافیلوکوکوس اورئوس بودن باکتری های جداشده از طریق تست های مانیتول سالت آگار، کاتالاز مثبت،کواگولاز مثبت، DNAse مثبت، و مقومت به باسیتراسین و حساسیت به لیزوستافین تایید شدند.

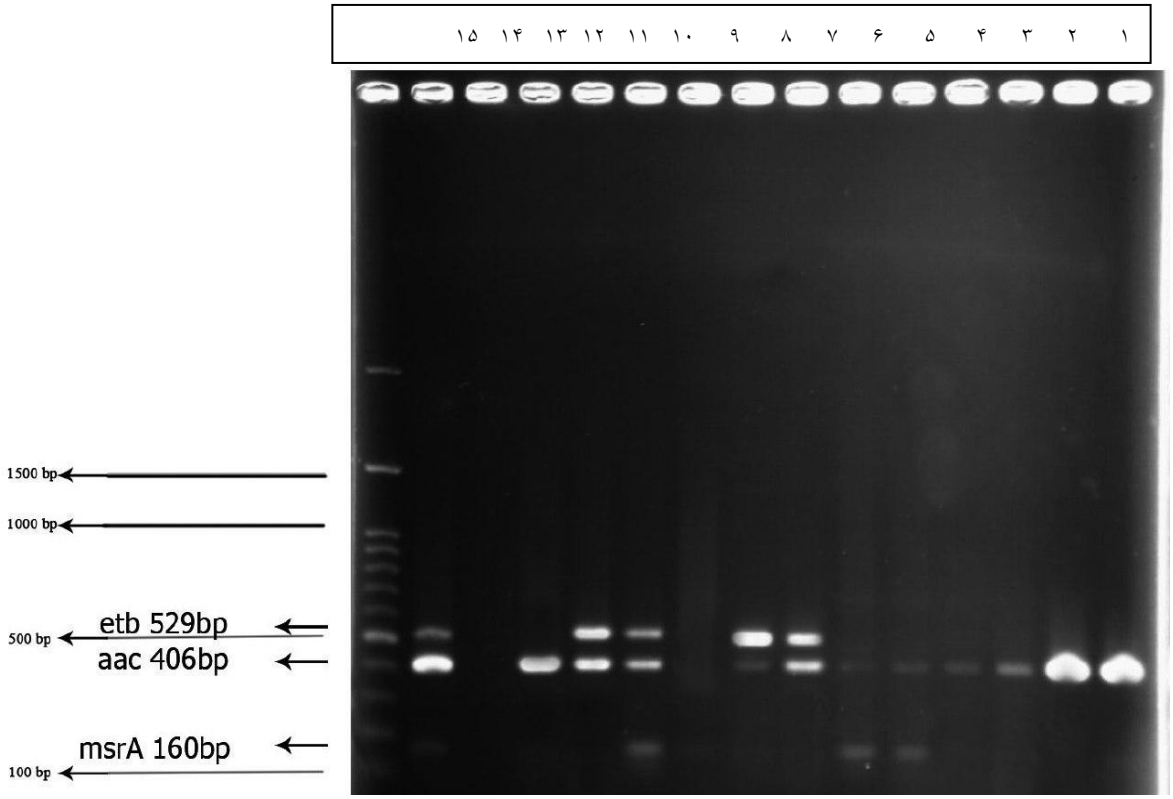
نتایج تست آنتی بیوگرام برای دیسک های اریترومایسین(۱۵ میکرو گرم) ، جنتامایسین(۱۰ میکروگرم)، توبرامایسین(۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین(۵ میکروگرم)، و لینزولید(۳۰ میکروگرم) در جدول ۴ آمده است .

جدول ۴- الگوی حاصل از تست حساسیت آنتی بیوتیکی در سویه های نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه

دیسک آنتی بیوتیکی	الگوی بدست آمده از نتایج آنتی بیوگرام		
	تعداد و درصد سویه های مقاوم(R)	تعداد و درصد سویه های نیمه حساس(I)	تعداد و درصد سویه های حساس(S)
اریترومایسین	۳ (٪۵)	(٪۵)۳	(٪۷۸/۳)۴۸
جنتامایسین	(٪۲)۱	(٪۲)۱	(٪۹۷)۵۸
توبرامایسین	(٪۲)۱	(٪۰)۰	(٪۹۸)۵۹
سیپروفلوکساسین	(٪۲)۱	(٪۰)۰	(٪۸۷)۵۲
لینزولید	(٪۰)۰	(٪۰)۰	(٪۱۰۰)۶۰

در دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ نسبت جذب نوری محلول‌های DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (۲۶۰/۲۸۰) که شاخص میزان خلوص DNA می‌باشد، با عدد ۱/۸ بدست آمد و باندهای حاصل از استخراج ژنوم روی ژل الکتروفورز ۱ ٪ مشاهده شد.

آزمون Multiplex-PCR برای تعیین وجود یا عدم وجود همزمان ژن های *msrA* (کد کننده مقاومت به کلیندامایسین) و *aac* (کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها) و *etb* (کد کننده اگزفولیاتیوتوکسین B) بر روی هر ۶۰ سویه جدا شده از موارد بالینی نشان داد که فراوانی ژن های *msrA* ، *aac* و *etb* به ترتیب برابر ۲۹(٪۴۸/۳)، ۴۵(٪۷۵) و۳۷(٪۶۱/۷) بود . این نتایج نشان داد که بیش ترین و کم ترین تعداد سویه ها به ترتیب دارای مقاومت به کلیندامایسین و آمینوگلیکوزید بودند. همچنین ، تعداد ۲۸ (٪۴۶/۶) ، ۲۲ (٪۳۶/۶) ، ۲۲ (٪۳۶/۶) و ۱۸ (٪۳۰) سویه به طور هم زمان به ترتیب دارای ژن های *etb/aac* ، *etb/msrA* ، *msrA/aac* و *msrA/aac/etb* بودند(شکل ۱).



شکل ۱- باندهای محصول Multiplex- PCR برای حضور همزمان ژن های msr A ، aac و etb - به ترتیب از راست به چپ عبارت اند : چاهک ۱: DNA marker 100 bp، چاهک ۲: چاهک کنترل مثبت (Staphylococcus aureus ATCC 29213) ، چاهک ۳: چاهک کنترل منفی (Enterococcus faecalis ATCC 19433) . چاهک ۴: حضور ژن aac (406bp) ، چاهک ۵: حضور ژن aac (406 bp) ،etb (529bp) ، چاهک ۶ : حضور ژن های aac (406bp) و etb (529bp) و msrA (160bp) ، چاهک ۸ : حضور ژنetb(529bp) , aac (406bp) , چاهک ۹: حضور ژن های aac (406bp) و etb (529bp) ، چاهک ۱۰: حضور ژن هایaac (406bp) و msrA (160bp) ، چاهک ۱۱: حضور ژن (406bp) aac و msrA(160bp) ، چاهک ۱۲: حضور ژن aac (406bp) ، چاهک ۱۳ : حضور ژنaac (406bp) ، چاهک ۱۴: حضور ژنaac (406bp) ، چاهک ۱۵: حضور ژنaac (406bp).

با توجه به جدول ۵ برای آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و اریترومایسین تعداد ۵۳ نمونه هاله عدم رشد و برای آنتی بیوتیک های جنتامایسین و لینزولید و توبرامایسین تعداد ۶۰ نمونه هاله عدم رشد مشاهده شد. هیچ ارتباط معنی داری بین مقاومت آنتی بیوتیک های مورد بررسی و ژن های *msrA, aac, etb* وجود نداشت(جدول ۶، $P > ۰/۰۵$ ، آزمون کای دو).

جدول ۵- نتایج اماری برای حساسیت به انتی بیوتیک ها و حضور ژن ها

	Genta	Cipro	Tob	Eryth	Line	*Etb*	*aac*	*msrA*
Valid	۶۰	۵۳	۶۰	۵۳	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
Number	۰	۷	۰	۷	۰	۰	۰	۰

ارتباط مقاومت هرآنتی بیوتیک به صورت مجزا با هرژن در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶- ارتباط مقاومت هرآنتی بیوتیک به صورت مجزا با هر ژن

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
		Percent	N	Percent	N	Percent
Genta * *Etb*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰
Genta * *aac*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰
Genta * *msrA*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰
Cipro * *Etb*		۸۸,۳	۷	۱۱,۷	۶۰	۱۰۰
Cipro * *aac*		۸۸,۳	۷	۱۱,۷	۶۰	۱۰۰
Cipro * *msrA*		۸۸,۳	۷	۱۱,۷	۶۰	۱۰۰
Tob * *Etb*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰
Tob * *aac*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰
Tob * *msrA*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰
Eryth * *Etb*		۸۸,۳	۷	۱۱,۷	۶۰	۱۰۰
Eryth * *aac*		۸۸,۳	۷	۱۱,۷	۶۰	۱۰۰
Eryth * *msrA*		۸۸,۳	۷	۱۱,۷	۶۰	۱۰۰
Line * *Etb*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰
Line * *aac*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰
Line * *msrA*		۱۰۰	۰	۰	۶۰	۱۰۰

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت بوده که به عنوان دومین پاتوژن شایع بیمارستانی مطرح است . این ارگانیسم بخشی از فلور طبیعی پوست و مجاری بینی می باشد و می تواند طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله عفونت‌های پوست و بافت نرم ، مسمومیت‌غذایی ، پنومونی ، سپتی‌سمی ، اندوکاردیت ، آبسه‌های مغزی ، انتروکولیت استافیلوکوکی ، سندرم شوک سمی را ایجاد نماید. همچنین به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می-باشد . مقاومت به آنتی بیوتیک یکی از مشکلات عمده بوده و استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها نقش عمده ای در ظهور باکتری های مقاوم ایفا می‌کند (۱۱).

در مطالعه حاضر به بررسی حضور ژن های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک روی پلاسیمد کد کننده اگزوفولیاتیو B در نمونه های پوستی آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداخته شد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه تعداد ۶۰ نمونه ی شناسایی شده به عنوان *استافیلوکوک اورئوس* از نمونه های زخم جمع آوری گردید . سپس تمامی نمونه ها به آزمایشگاه منتقل شدند و با استفاده از تست های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژی تایید شدند . سپس تست حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون آگار و با استفاده از دستورالعمل CLSI انجام گردید . در این مطالعه الگوی حاصل از تست حساسیت آنتی بیوتیکی در سویه های تحت بررسی *استافیلوکوکوس اورئوس* شامل تعداد و درصد سویه های حساس (S) و نیمه حساس (I) و مقاوم (R) به ترتیب به جنتامایسین ۵۸ (۹۷٪) سویه حساس و ۱(۲٪) سویه نیمه حساس و۱ (۲٪) سویه مقاوم و سیپروفلوکساسین ۵۲ (۸۷٪) سویه حساس و ۱(۲٪) سویه مقاوم و تعداد ۷ سویه هیچ الگوی آنتی بیوتیکی مشاهده نشد و توبرامایسین ۵۹(۹۸٪) سویه حساس و ۱ (۲٪) سویه مقاوم و اریترومایسین ۴۷ (۷۸٪) سویه حساس و ۳ (۵٪) سویه نیمه حساس و ۳(۵٪) سویه مقاوم و لینزولید ۶۰ سویه (۱۰۰٪) حساس می باشد . در این مطالعه میزان مقاومت به اریترومایسین ، جنتامایسین ، توبرامایسین ، سیپروفلوکساسین و لینزولید به ترتیب برابر ۳ (۵٪) ، ۱(۲٪) ، ۱(۲٪) ، ۱(۲٪) و ۰(۰٪) بود . سپس استخراج DNA توسط کیت انجام شد و واکنش Multiplex- PCR روی ۶۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* برای بررسی حضور همزمان ژن های *etb* ، *aac* و *msrA* انجام گردید . نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که فراوانی ژن های *msrA* ، *aac* و *etb* به ترتیب برابر ۲۹ (۴۸/۳٪) ، ۴۵ (۷۵٪) و ۳۷ (۶۱/۷٪) بود . در این مطالعه بیش ترین فراوانی مربوط به ژن *aac* و کم ترین فراوانی مربوط به ژن *msrA* می باشد و بیش از نیمی از سویه ها دارای ژن *etb* بودند . نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که فراوانی بالای ژن های کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها (*aac*) حاکی از افزایش مصرف این آنتی بیوتیک ها و در نتیجه احتیاط در مصرف آنها مگر مطابق با تعیین حساسیت میکروبی می باشد و نتیجه گیری آماری نشان داد هیچ ارتباط معنی داری بین مقاومت آنتی بیوتیک های مورد بررسی و ژن های *msrA, aac, etb* وجود ندارد زیرا Pvalue بدست آمده از روش آماری SPSS در آن ها بزرگتر از ۰/۰۵ بود.

رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۴ ، ۲۹۳ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* را با استفاده از تست های بیوشیمیایی از نمونه های بیمارستانی شناسایی نمودند و پس از بررسی با روش انتشار دیسک از نظر مقاومت به آنتی بیوتیک ها مشخص نمودند که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین (۸۸٪) و پس از آن به ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین (۸۵٪)، کلیندامایسین (۸۴٪، توبرامایسین (۸۱٪)، کانامایسین (۷۹٪)، آمیکاسین (۷۵٪) و تتراسایکلین (۷۱٪) بوده است (۱۲) نتایج مطالعه آنها به دلیل تفاوت در نوع و تعداد نمونه های مورد بررسی با پژوهش حاضر متفاوت بوده است. در مطالعه ایی که مکه و همکاران در سال ۲۰۱۶ در تعیین الگوی مقاومت آنتی بیتیکی ۲۵ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام دادند مشخص شد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به تتراسایکلین (۱۰۰٪) و سپس نسبت به متی سیلین (۸۴/۳۷٪) ، سفوتاکسیم (۷۸/۱۲٪) و امپی سیلین (۷۵٪) بوده است. همچنین انان نشان دادند بین نوع نمونه ها و میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی اختلاف معنی داری وجود دارد (۱۳). کیانی نیا و همکاران در سال ۲۰۱۳ روی ۹۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های مختلف بالینی تست حساسیت انتی بیوتیکی انجام دادند و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها به ترتیب نسبت به پنی سیلین (۹۷٪/۸)، اگزاسیلین (۷۲/۲٪)، اریترومایسین (۷۱/۱٪)، سفوکسی تین (۷۰٪)، سیپروفلوکساسین (۶۴/۴٪)، جنتامایسین (۵۳/۹٪)، کلیندامایسین (۴۲/۲٪)، ریفامپی سین (۱۸/۴٪)، ونکومایسین (۱۲٪/۲) و سفازولین (۷/۸٪) مشاهده شد. انها همچنین با روش Multiplex PCR حضور همزمان ژن های مقاوم به انتی بیوتیک های رایج شامل *nuc, femB, mecA* و *aac(6)/aph(2'')-Ia* را در نمونه های مورد مطالعه شناسایی نمودند (۱۴). در مطالعه حاضر نیز بیشترین مقاومت نسبت به اریترومایسین و سپس نسبت به جنتامایسین مشاهده شد. همچنین حضور ژن *aac* که مقاوم به انتی بیوتیک های امینوگلیکوزیدی می باشد نیز شناسایی گردید. شیتو و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و انالیز مولکولی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در بیمارستان های نیجریا پرداختند. مطالعه آنها نشان داده است که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین (۸۸/۲٪) و پس از ان نسبت به تری متوپریم (۷۲/۱٪)، تتراسایکلین (۵۵/۹)، سیپروفلوکساسین (۲۹/۴٪)، اگزاسیلین (۱۶/۲٪)، جنتامایسین (۱۴٪/۷)، اریترومایسین (۱۱/۸) و موکسی فلوکساسین (۱۰/۳٪) بوده است و نسبت به ونکومایسین و لینزولید حساس بودند. همچنین از نظر مولکولی حضور ژن های *aacA-D, tetk, tetM, mecA,* و *ermA* را در سویه های مقاوم به چندین دارو شناسایی

نمودند (۱۵). مقایسه تحقیق حاضر با تحقیق شیتو نشانگر این نکته است که در هر دو پژوهش بیشترین مقاومت به اریترومایسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین مشاهده می شود ولی در هر دو مطالعه سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به لینزولید حساس بوده اند و همچنین حضور ژن های *aac* در هر دو پژوهش تاییدگر گسترش ژن های مقاومت به امینوگلیکوزیدها در بین این سویه باکتریایی می باشد. در مطالعه نوربخش و همکاران که در سال ۲۰۱۵ روی الگوی مقاومت انتی بیوتیکی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بیماران بیمارستان اصفهان انجام گرفته است مشخص شده که بیشترین مقاومت انتی بیوتیکی به ترتیب نسبت به متی سیلین (۹۰/۲٪)، اریترومایسین (۸۹/۷٪)، سیپروفلوکساسین (۸۹/۵٪)، پنی سیلین (۸۸٪)، تتراسایکلین (۸۲/۴٪) و جنتامایسین (۷۵/۸٪) بوده است. همچنین در بررسی های مولکولی که با روش Multiplex PCR در ایزوله هایی که مقاومت چند دارویی داشتند، انجام دادند حضور ژن های *mecA, tetk* و *tetM* را گزارش نمودند (۱۶). دیباج و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی فراوانی و میزان کلونیزاسیون سویه های مقاوم به انتی بیوتیک *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداختند. نتایج انها نشان داد که از ۱۱۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۹/۵٪ مقاوم به متی سیلین و دارای ژن *mecA* بودند. همچنین همه ایزوله ها نسبت به وانکومایسین، ریفامپین و لینزولید حساس بودند (۱۷). در مطالعه حاضر نیز سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه همگی نسبت به انتی بیوتیک لینزولید حساس بودند. در مطالعه ایی که پنک و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشور چین بر روی الگوی مقاومت انتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین انجام گرفته است، گزارش شده که از ۱۱۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های بالینی ۱۰۰٪ نسبت به امپی سیلین، اکساسیلین، جنتامایسین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاوم و نسبت به وانکومایسین، کلرامفنیکل و مینوکسی سیلین حساس بودند. همچنین بررسی مولکولی روی تیپ های مختلف SCCmec نشانگر حضور همزمان تیپ های مختلف کاست کروموزومی mec در میان ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین بود (۱۸). در این تحقیق نیز بیشترین میزان مقاومت نسبت به اریترومایسین مشاهده شد. احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ به تعیین الگوی مقاومت انتی بیوتیکی در سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی پرداختند. در مطالعه انها که مانند مطالعه حاضر با روش انتشار دیسک انجام گرفت، بیشترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به انتی بیوتیک پنی سیلین (۹۰٪)، تتراسایکلین (۷۶٪)، متی سیلین (۶۴٪)، امپی سیلین (۵۵٪) و کمترین مقاومت نسبت به انتی بیوتیک نیتروفورانتوئین (۸٪) و ونکومایسین (۱۴٪) گزارش شده است. همچنین آنها با بررسی مولکولی که با روش Multiplex PCR انجام دادند حضور همزمان ژن های *tetM, mecA, msrA, aacA-D* و *tetK* را در سویه های مقاوم به دارو نشان دادند (۱۹). در مطالعه حاضر نیز مشابه تحقیق احمدی و همکاران، حضور همزمان ژن های *etb ,aac ,msrA* در سویه های مقاوم به دارو گزارش شده است. در تحقیق لیاکوپولوس و همکاران که در سال ۲۰۱۱ روی مقاومت گونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به امینوگلیکوزیدها در کشور یونان صورت گرفته است، مشخص شده که از ۱۲۲۸ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه ۵۱٪/۸ موارد نسبت به امینوگلیکوزیدها حساس بودند. نتایج انها نشان داده است که ۴۸/۲٪ سویه ها نسبت به امیکاسین و کانامایسین و ۱۲/۹٪ نسبت به توبرامایسین و ۶/۳ ٪ نسبت به جنتامایسین مقاوم بودند. همچنین انان با بررسی مولکولی روی ۴۸٪/۲ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به امینوگلیکوزیدها، حضور ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک های امینوگلیکوزیدی *aph(3)-IIIa, ant(4')-Ia* و *aac(6')-Ie-aph(2'')* را نشان دادند (۲۰). در تحقیق حاضر نیز مقاومت نسبت به انتی بیوتیک های توبرامایسین و جنتامایسین مشاهده شد و همچنین حضور ژن *aac* که کد کننده مقاومت نسبت به امینوگلیکوزیدها است، در سویه های مقاوم به دارو شناسایی شد.

تفاوت های موجود بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر دلیلی بر تفاوت در فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در بین کشورهای مختلف ، بیمارستان های متفاوت و بخش های بیمارستانی و حتی بین نوع نمونه های مختلف حاصل از افراد یک جامعه می تواند باشد . همچنین با توجه به میزان مصرف آنتی بیوتیک در این مناطق و بروز مکانیسم های مختلف مقاومت، انتخاب و انتشار کلون های مقاوم ، تحت فشار مصرف آنتی بیوتیک است. بنابراین این موضوع می تواند دلیلی برای انجام این گونه مطالعات باشد تا بتوان الگوی مقاومتی هر منطقه و بیمارستان را شناسایی نمود و در راستای آن، شیوه های کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار مقاومت به چندین دارو و مهم تر از همه انتخاب شیوه های مناسب درمانی برای رهایی بیماران از عفونت های ناشی از این پاتوژن مهم و بسیار مقاوم بیمارستانی (*استافیلوکوکوس اورئوس*) و پرهیز از تجویز انتی بیوتیک های غیر ضروری در سویه های حساس را مهیا نمود.

نتیجه گیری

نتایج آزمون مولکولی نشان داد که فراوانی بالای ژن های کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها (*aac*) حاکی از افزایش مصرف این آنتی بیوتیک ها و در نتیجه احتیاط در مصرف آنها مگر مطابق با تعیین حساسیت میکروبی باید صورت گیرد. به طور کلی بهتر است تا سایر ژن های ویرولانس نیز بررسی گردند تا بتوان اپیدمیولوژی درستی از فراوانی ژن ها را مشخص نمود . با توجه به نتایج آنتی بیوگرام ، انجام آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی به منظور کاهش

هزینه ها ، بروز عفونت های بیمارستانی و جلوگیری از شکست درمان توصیه می شود. همچنین با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات مشابه مشاهده می شود که فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت می باشد لذا شاید این دلیلی برای تفاوت بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات فوق باشد. با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی رویه این داروها، تشخیص سریع و به موقع سویه های مقاوم ، به منظور انتخاب گزینه های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و مدیریت و پرسنل آزمایشگاه پاسارگارد که ما را در انجام مراحل این پروژه یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی می گردد.

REFERENCES

1. Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Pozzi E, Cauda R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008;61(1):26-38.
2. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus.* Toxins. 2010;2(5):1148-65.
3. McNeil JC, Hulten KG, Kaplan SL, Mason EO. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* causing recurrent skin and soft tissue infections in children. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011;55(5):2431-3.
4. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae I-G, Stryjewski ME, Federspiel JJ, et al. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. Journal of clinical microbiology. 2008;46(2):678-84.
5. Caldelari I, Chane-Woon-Ming B, Noirot C, Moreau K, Romby P, Gaspin Ch, Marz S.
Complete Genome Sequence and Annotation of the *Staphylococcus aureus* Strain HG001. Genome Announc. 2017; 5(32): e00783-17.
6. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et al. Global gene expression in Staphylococcus aureus biofilms. Journal of bacteriology. 2004;186(14):4665-84.
7. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006;50(3):1001-12.
8. Nguyen DT, Yeh E, Perry S, Luo RF, Pinsky BA, Lee BP, et al. Real-time PCR testing for mecA reduces vancomycin usage and length of hospitalization for patients infected with methicillin-sensitive staphylococci. Journal of clinical microbiology. 2010;48(3):785-90.
9. MansouriGhiasi M, NasrollahiOmran A, Hashemi M, Rajab ZadeKanafi P, Jahangiri Rad Manjili M. The Prevalenceof Antibiotic Resistance Pattern of Staphylococcus Aureus Isolated from Nasal Carriage of Surgical Ward's Staff in ShahidrajaeeHospitalofTonekabon,Iran. Medical Laboratory Journal. 2013;7(1):35-9.
10. Vaez H, Ghazi Saeidi K, Moradi A, Tabaraei A, Khodabakhshi B, Bazouri M, et al. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Health-educational centers of Gorgan, Iran, 2008-2009. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2010;3(4):31-6.
11. Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain ST398 is present in midwestern US swine and swine workers. PloS one. 2009;4(1):e4258.
12. Rahimi F, Karimi Sh, Porshafie MR. Typing of Methicillin-resistant *Staphilocuccus aureus* strains isolated from paitents in esfehan. Iranian Journal of Infectious Desease. 2014; 64: 21-30.
13. Makeh S, Mashak Z. Frequency of antibiotic resistance and SCCmec types in *Staphilocuccus aureus* strains isolated from meat. Iranian Journal of Infectious Desease. 2017; 75: 55-61.
14. Kiani Nia M, Hasani A, Hasani A, Sharifi Y, Mirza Ahmadi S, Deghani L. Investigation and Identification of the *nuc*, *fem* B *mec*A and *aac(6')/aph(2'')-Ia* Genes in the *Staphylococcus Aureus* Isolated

from Northwest Iran by Multiplex PCR Method. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services. 2013; 35(1): 68-73.
15. Shittu AO, Okon K, Adesida S, Oyedara O,Witte W, Strommenger B, et al. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *staphylococcus aureus* in Nigera. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 92.
16. Nourbakhsh F, Momtaz H.. Detection of antibiotic resistance patterns in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients admitted to Isfahan hospitals during 2014-2015. *Journal of Kashan University of Medical Science. 2015; 19(4): 356-363.*
17. Dibaj R, Shoaei P, Hashemi A, Daei Naser A, Shojaei H. Study of Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* and CAMRSA Nasal Colonization in 2-5 Years Old Children in Isfahan. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (3) :22-30 .
18. Peng Q, Hou B, Zhou Sh, Huang Y, Hua D, Yao F, Yuan, Qian Sh. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in a teaching hospital, Shantou, China. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4(9): 844-848.
19. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance pattern in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples obtained from patients hospitalised in Imam Reza hospital, Kermanshah. Journal of Microbial World. 2014; 6(4): 229-311.
20. Liakopoulos A, Foka A, Vourli S, Zerva L, Tsiapara F, Protonotariou E, Dailiana Z,Economou M, Papoutsidou E, Koutsia Carouzou C, Anastassiou ED, Diza E, Zintzaras E,Spiliopoulou I, Petinaki E. Aminoglycoside-resistant staphylococci in Greece: prevalence and resistance mechanisms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(5): 701-705.