مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی ژن مقاومت به متی سیلین (MRSA) در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن لکوسیدین پنتون والنتین (*pvl*) جداشده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر رشت

حورا پورغفار[۱]، نور امیرمظفری[۲*]، معصومه انوری[۳]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۰۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۸/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس لکوسیدین پنتون والنتین (*pvl*) مثبت دارای ویرولانس بالایی بوده و بیشتر با آبسه‌های پوستی و عفونت‌های نکروتیک شدید همراه می‌باشند. مطالعه حاضر، بررسی فراوانی ژن *pvl* و مقاومت به متی سیلین (MRSA) در بیماران بیمارستان‌های رشت در شمال ایران است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۹۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس در طی شش ماه نمونه‌گیری به دست آمد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش Disk Diffusion انجام شد و تست مقاومت به متی‌سیلین به‌وسیله‌ی دیسک اگزاسیلین انجام گردید. سنجش ژن *pvl* برای تمامی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد، سپس نمونه‌های مثبت که دارای ژن *pvl* بودند، جهت جستجوی ژن *mec*A با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن موردبررسی قرار گرفتند.

نتایج: از مجموع جدایه ۱۸ مورد (۱۹/۵۶ درصد) ازنظر وجود ژن *pvl* مثبت بودند و در میان ۱۸ جدایه *pvl* مثبت، ۱۵ جدایه (۸۳/۳۳ درصد)MRSA و ۳ جدایه (۱۶/۶۶ درصد) MSSA بودند و ۸ مورد (۴۴/۴۴ درصد) از ۱۸ جدایه ازنظر داشتن *mec*A مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: با تأکید بر وجود ژن *pvl* در جدایه‌های MRSA، تولید توکسین PVL یک تهدید جدی برای سلامتی افراد محسوب می‌شود. به نظر می‌رسد، دستیابی به یک روش سریع و تکرارپذیر در مراکز پزشکی برای کنترل عفونت با سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مولد PVL لازم و ضروری است.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، لکوسیدین پنتون والنتین، *mec*A، MRSA

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است و در زیر میکروسکوپ ظاهری شبیه خوشه انگور دارد و به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای شایع در موارد بیمارستانی شناخته می‌شود. مطالعه‌ها نشان می‌دهد ۱۵ تا ۲۰ درصد از افراد ناقل این باکتری هستند (۱). این باکتری موجب طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها شامل اندوکاردیت، آرتریت، استئومیلیت، پنومونی، سپتی سمی، سندروم شوک توکسیک، کورک یا دمل می‌شود. مهم‌ترین راه انتقال این باکتری به‌ویژه در مراکز درمانی، دست‌های آلوده است (۱ و ۲).

پاتوژنیسیته استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به ترکیبات متنوع سطوح باکتری شامل مولکول‌های ماتریکس چسبنده (مانند فاکتور توده‌ای کننده)، پروتئین‌های خارج سلولی (مانند کواگولاز، همولیزین) انتروتوکسین، توکسین سندروم شوک سمی اکسفولیاتیو و لکوسیدین پنتون والنتین (Panton-Valentin leucocidin) است (۱). مقاومت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این باکتری‌ها بیشتر از سایر باکتری‌های دیگر مقاومت دارویی نشان

*نویسنده مسئول: **نور امیرمظفری**، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
Email: amirmozafari@iums.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-5186-8406

می‌دهند. همچنین بر اساس منطقه جغرافیایی دستخوش تغییرات قابل‌توجهی در الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در طول سالیان گذشته شده است. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجادشده توسط استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مانند بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و غیره است. این امر موجب گسترش عفونت‌های ناشی از این باکتری و همچنین افزایش بروز مشکلاتی مانند میزان مرگ‌ومیر، میزان جراحات وارده به بیماران بستری، هزینه‌های درمان از طریق نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های گران‌قیمت و مدت‌زمان بستری بیماران در بیمارستان‌ها گردیده است (۳).

لکوسیدین پنتون والنتین به‌شدت با سویه‌های (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) MRSA در ارتباط است (۴). سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس PVL مثبت دارای ویرولانس بالایی هستند و بیشتر با آبسه‌های پوستی و عفونت نکروتیک شدید همراه می‌باشند (۵). نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات مختلف نشان‌دهنده افزایش استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین MRSA است (۴ و ۵). دلیل این مسئله انتقال ژن *mecA* توسط این سویه‌ها است. این ژن پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین بانام PBP2a کد می‌کند که میل پیوندی پایینی برای اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام‌ها دارند. درنتیجه سنتز پپتیدگلیکان در دیواره سلولی باکتری‌ها علی‌رغم حضور این داروها ادامه پیدا می‌کند (۳).

Panton و Valentine در سال ۱۹۳۲ توکسین لوکوسیدین پنتون والنتین را از یک بیمار مبتلا به فورنکلوزیس (Furunculosis) جداسازی نمودند (۶). پنتون والنتین یک گاما توکسین شامل دو جزء S (۳۸ کیلو دالتون) و F (۳۲ کیلو دالتون) است که تحت کنترل ژن‌های *luk/PV* و *lukf/PV* است (۷). این توکسین توسط یک باکتریوفاژ حمل می‌شود و قابل‌انتقال به سایر استافیلوکوکوس‌ها است. پنتون والنتین علیه غشای خارجی سلول‌های پلی مورفونوکلئار، مونوسیت‌ها و ماکروفاژهای انسانی عمل می‌کند و بسته به غلظت توکسین، باعث باز شدن کانال‌های کلسیم می شود (۸ و ۹). ژن‌های *luk/PV* و *lukf/PV* می‌توانند توسط سویه‌های مقاوم به متی سیلین (MRSA) و حساس به متی سیلین (MSSA) حمل شوند (۱۰). با توجه به این‌که مطالعات مختلف، افزایش انواع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را نشان می‌دهد و استافیلوکوکوس اورئوس PVL مثبت با سویه‌های مقاوم به متی سیلین مرتبط است، در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. بنابراین با توجه به اهمیت آن، هدف از این مطالعه ارزیابی، فراوانی ژن *pvl* در بین سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از بیمارستان‌های شهر رشت و بررسی حضور ژن *mecA* برای تائید سویه‌های MRSA در میان نمونه‌های دارای ژن *pvl* می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی میکروبی سویه‌ها: در این مطالعه، از بهمن تا تیر ۱۳۹۵ با تأییدیه کمیته اخلاق پژوهش به شماره ۱۶۳۳۰۵۰۷۹۴۱۰۲۳ و رضایت‌نامه کتبی از بیماران، تعداد ۱۲۰ نمونه بالینی مختلف (زخم، پوست، خون، تراشه و ادرار) از مراکز تشخیصی درمانی مختلف (بیمارستان‌های رازی، پورسینا و قائم) شهر رشت جمع‌آوری گردید. شناسایی فنوتیپی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به‌وسیله رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های کاتالاز، کواگولاز، DNase، کشت روی محیط مانیتول سالت آگار (MSA) و DNase آگار (مرک، آلمان) صورت گرفت (۱۱).

ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی: انجام آزمایش حساسیت (آنتی بیوگرام) با استفاده از روش Kirbery Bauer و طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) Clinical and laboratory standards institute با استفاده از روش Disk Diffusion بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar) انجام شد (۱۲). حساسیت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب) ونکومایسین، اگزاسیلین (1µg)، تیکوپلانین (30µg)، جنتامایسین (10µg)، تتراسیکلین (30µg)، سیپروفلوکساسین (5µg)، سفوکسیتین (30µg)، لینزولید (10µg) در محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) بررسی گردید. به‌منظور تشخیص مقاومت متی سیلین (MRSA) از دیسک اگزاسیلین استفاده شد. در این مطالعه از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591 به‌عنوان کنترل مثبت (حاوی ژن *mecA*) و از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC49775 به‌عنوان کنترل مثبت (حاوی ژن *pvl*) و از استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ATCC12228 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA (High pure PCR Template Preparation kit) ساخت

شرکت Roche آلمان استفاده شد و مراحل استخراج DNA بر اساس دستورالعمل کیت صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR): به‌منظور تکثیر ژن *mecA* (146pb) از پرایمرهای اختصاصی با توالی زیر استفاده گردید (۱۲).

mecA -F: 5'GTGAAGATATACCAAGTGATT3'
mecA -R: 5'ATGCGCTATAGATTGATTGAAAGGA

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱/۵ میکرولیتر بافر (25mM) $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۲ میکرولیتر از هر پرایمر (10pmol)، ۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی مراز (5U/ μl) و ۱ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و درنهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. به‌منظور تکثیر ژن *pvl* از پرایمرهای اختصاصی با توالی (575pb) زیر استفاده گردید (۱۳).

LukS-PV-F: 5'AGAAGATACAAGTAGCGATAAGTG3'
LukS-PV-R: 5'AAGGATTGAAACCACTGTGTAC3'

واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و درنهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. برای مشاهده طول محصولات موردنظر از روش الکتروفورز و ژل آگاروز ۱ درصد استفاده گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری: برای این منظور از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد.

نتایج

جداسازی و تشخیص نمونه‌های بالینی: در این مطالعه درمجموع ۹۲ نمونه ادرار، خون، پوست و زخم از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر رشت جمع‌آوری شد. فراوانی نمونه‌ها برحسب نوع نمونه در جدول ۱ آمده است. با استفاده از آزمون‌های میکروبی، رنگ‌آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت آگار،

جدول ۱- توزیع فراوانی انواع نمونه‌های *S. aureus* گرفته‌شده از بیماران (۹۲ نفر)

انواع نمونه	تعداد	درصد
خون	۱۷	۱۸/۵
زخم	۳۹	۴۲/۴
تراشه	۹	۹/۸
مایعات بدن	۷	۷/۶
ادرار	۲۰	۲۱/۷
جمع	۹۲	۱۰۰

آزمون‌های کاتالاز و کواگولاز، مورد تائید قرار گرفتند.

ارزیابی حساسیت میکروبی: نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که از ۹۲ جدایه موردبررسی، ۴۳ جدایه (۴۶/۴ درصد) نسبت به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین مقاوم بودند و به‌عنوان MRSA در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۳۰/۴۳ درصد، لینوزولید ۲۸/۲۶ درصد، جنتامایسین ۲۳/۹۱ و تتراسیکلین ۲۲/۸۲ درصد مشاهده شد. بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین ۶۵/۲۱ درصد گزارش گردید. درمجموع میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه جداسازی شده از نمونه‌های ادرار و زخم بیشتر از خون و پوست بود (جدول ۲).

نتایج تکثیر ژن *mecA* (۱۴۶ pb) و ژن *pvl* (۵۷۵ pb) در شکل ۱ ذکرشده است. از مجموع ۹۲ جدایه نمونه جداسازی شده

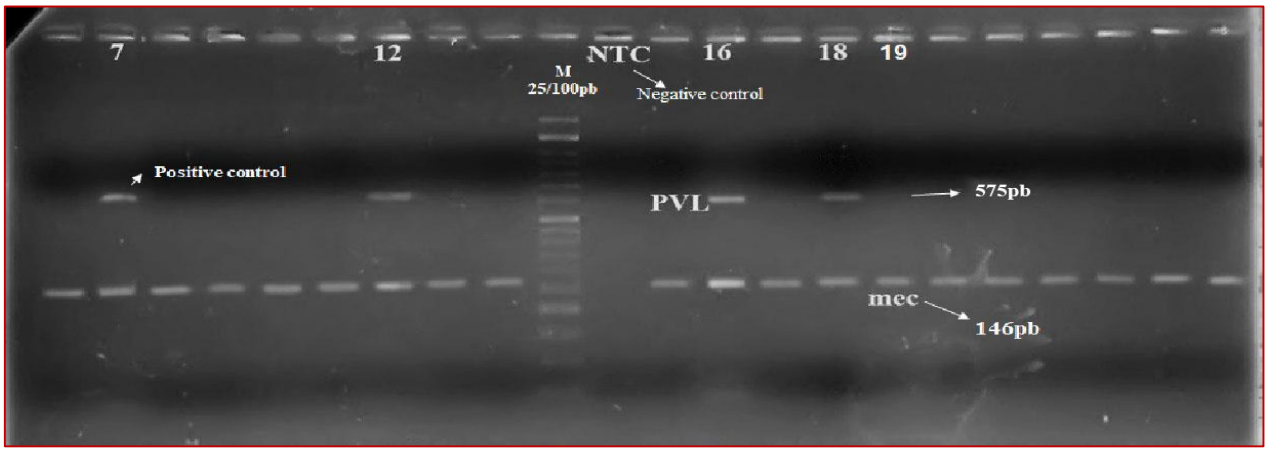
استافیلوکوکوس اورئوس، فراوانی ژن *mecA* ۸ جدایه (۸/۷ درصد) و ژن *pvl* ۱۸ جدایه (۱۹/۵۶ درصد) بودند. لازم به ذکر است، فراوانی ژن *mecA* در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه‌های زخم بیشتر از سایر نمونه‌ها بود. در میان ۱۸ جدایه *pvl* مثبت، ۱۵ جدایه (۸۳/۳۳ درصد) MRSA و ۳ جدایه (۱۶/۶۶ درصد) MSSA بودند و ۸ مورد (۴۴/۴۴ درصد) از میان ۱۸ جدایه *pvl* مثبت، ازنظر داشتن *mecA* مثبت بودند.

بحث

امروزه مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشکلات فراوانی را در درمان بیماری‌های ناشی از این ارگانیسم در نقاط مختلف جهان ایجاد کرده است و یکی از مهم‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی است. فراوانی سویه‌های مقاوم به متی سیلین بیشتر به بخش‌های عفونی، جراحی و سوختگی مربوط می‌شود (۱۴). خطر بالقوه انتشار سویه‌های مقاوم به متی سیلین در بخش مراقبت‌های ویژه به دلیل مشکلات بیشتر بیماران، دست‌کاری‌های متعدد پزشکی و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها همیشه موردتوجه بوده است (۱۵). اطلاعات کمی در مورد میزان ارتباط مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و ژن *pvl* در برخی از شهرهای ایران وجود دارد. در این مطالعه از مجموع ۹۲ جدایه، ۱۹/۵۶ درصد ازنظر وجود ژن *pvl* مثبت مشاهده شدند و در میان *pvl* مثبت‌ها، ۸۳/۳۳ درصد MRSA و ۱۶/۶۶ درصد MSSA و ۴۴/۴۴ درصد *mecA* مثبت بودند. در مطالعه حاضر

جدول ۲- میزان مقاومت و حساسیت سویه‌های *S. aureus* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های CLSI

آنتی‌بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
ونکومایسین	۲	(۲/۱۷)	۳۰	(۳۲/۶)	۶۰	(۶۵/۲۱)
اگزاسیلین	۴۳	(۴۶/۴)	۲۵	(۲۷/۱۷)	۲۵	(۲۷/۱۷)
تیکوپلانین	۱۲	(۱۲/۰۴)	۳۶	(۳۹/۱۳)	۴۴	(۴۷/۸۲)
جنتامایسین	۲۲	(۲۳/۹۱)	۳۱	(۳۳/۶۹)	۳۹	(۴۲/۳۹)
تتراسیکلین	۲۱	(۲۲/۸۲)	۴۵	(۴۸/۹۱)	۲۶	(۲۸/۲۶)
سیپروفلوکساسین	۲۸	(۳۰/۴۳)	۱۶	(۱۷/۳۹)	۴۸	(۵۲/۱۷)
سفوکسیتین	۱۴	(۱۵/۲۱)	۴۵	(۴۸/۹۱)	۳۳	(۳۵/۸۶)
لینوزولید	۲۶	(۲۸/۲۶)	۲۹	(۳۱/۵۲)	۳۷	(۴۰/۲۱)



شکل ۱– الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *mecA* و *pvl* بر روی ژل آگارز. نتایج PCR: نمونه‌های حاوی ژن *mecA* (۱۴۶bp) در ستون ۱۶، ۱۲ و ۱۸. نمونه حاوی ژن *pvl* (۵۷۵bp) در ستون شماره ۱۹. NTC کنترل منفی *S. epidermitis* ATCC12228 و ستون ۷ کنترل مثبت *S. aureus* ATCC49775. Ladder 25/100 bp

بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین، سیپروفلوکساسین بیشترین حساسیت نسبت به ونکومایسین ۶۵/۲۱ درصد بود.

Santosaningish و همکاران در سال ۲۰۱۴، اپیدمیولوژی و سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن *pvl* را در بیمارستان‌های جاوه و بالی اندونزی موردبررسی قرار دادند. پانزده درصد جدایه‌ها *pvl* مثبت بودند و ۴/۳ درصد مقاومت به متی سیلین و ۱/۵ درصد حساسیت به متی سیلین را در جدایه‌های *pvl* مثبت نشان دادند (۱۶).

حق گو (Haghgo) و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ۷۱ جدایه در کشت‌های خونی، ۱۸ درصد استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی نمودند که بیشترین مقاومت نسبت به متی سیلین و سفتریاکسون به میزان ۳۱ درصد بوده است (۱۷).

در این مطالعه از ۱۸ نمونه جدایه *pvl* مثبت، ۵۵/۵ درصد بودند که همانند مطالعه Sun و همکاران در چین است (۱۸). در مطالعه‌ی Orrett و Land، از ۲۴۳ سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از منابع بیمارستانی، ۲۰/۸ درصد MRSA بودند (۱۹).

تحقیق Miller و همکاران بر روی ۱۸۰ سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند که ۶۰ درصد MRSA بودند (۲۰). دارابی و همکاران در مطالعه‌ی خود بر روی سویه‌های جداشده از بیماران و کارکنان بیمارستانی میزان مقاومت به متی سیلین را ۹۰ در صد گزارش نمودند (۲۱). از ۱۳۱ جدایه MRSA که از بینی و گلوی افراد سالم مکزیکی در سال ۲۰۱۴ جمع‌آوری شد، ۲۱/۴ درصد MRSA بودند (۲۲). در مطالعه‌ی دیگر که در تهران در سال ۲۰۱۴ به‌عمل‌آمده، از ۱۵۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از بینی افراد، ۴/۵ درصد MRSA شناسایی شد (۲۳) و در عربستان سعودی هم در سال ۲۰۱۰، از ۱۳۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جمع‌آوری‌شده، ۹۴ درصد MRSA بودند (۲۴).

در این مطالعه از ۹۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، ۴۷/۸۲ درصد MRSA بوده که بیشتر از مطالعه Orrett و Land و تهران و کمتر از Miller، دارابی و عربستان است.

از ۲۰۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس که از بیمارستان‌های چین در سال ۲۰۱۳ جمع‌آوری‌شده بود، ۴/۹ درصد دارای ژن *pvl* بودند (۱۸). ملا عباس زاده و همکاران شیوع ژن *pvl* را در ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس موردبررسی ۱۸ درصد گزارش دادند (۲۵).

در مطالعه Cupane و همکاران، ۷۵ درصد جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن *pvl* بودند (۸). Brown و همکاران در پژوهش خود، از ۱۰۵۵ سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس ۳۵/۷ درصد، *pvl* مثبت بودند (۱۰). Osman و همکاران میزان فراوانی ژن *pvl* را در میان نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در سودان بررسی نمودند. از میان ۲۱۰ نمونه جداشده، ۵۸ درصد ژن *pvl* دیده شد (۲۶). در این مطالعه ۱۸ نمونه از مجموع ۹۲ نمونه دارای ژن *pvl* بودند که مشابه ملاعباس زاده و کمتر از مطالعه Brown، Cupane و Osmanاست.

Cheng و همکاران، حضور ژن *pvl* را در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداشده از عفونت پوست بررسی کردند. در این مطالعه درمجموع ۲۵۹ نمونه MRSA از بیماران بستری در چین جداسازی شد. نتایج نشان داد که ۲۸/۶ درصد از جدایه‌ها حامل ژن *pvl* بودند (۲۷). مقدم و همکاران در سال ۲۰۱۲، میزان فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین حامل ژن *pvl* را در بیمارستان‌های اصفهان، از مجموع ۵۶ جدایه، ۱۴/۳ درصد گزارش دادند (۲۸). در مطالعه خسروی و همکاران فراوانی ژن *pvl* در جدایه‌های MRSA برابر ۷/۲ درصد و در جدایه‌های MSSA برابر ۳۳/۳ درصد گزارش گردید (۲۹). در این مطالعه فراوانی ژن *pvl* در جدایه‌های MRSA ۶۰ درصد است که نسبت به مطالعه مقدم و خسروی بیشتر بود.

نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوس‌ها به دلیل استفاده‌ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود توانایی بالا در تبادلات ژنتیکی و ژن‌های مقاومتی با حضور انواع پلاسمیدها به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان مقاومت نشان می‌دهند (۹). معتمدی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ حضور هم‌زمان ژن‌های *pvl* و *mecA* در نمونه‌های خود را تائید کردند (۳۰). در میان نمونه‌های موردمطالعه ما، فراوانی ژن *mecA* ۸/۷ درصد و ژن *pvl* ۱۹/۵۶ درصد بودند. در سال ۲۰۱۴ از ۲۰۰ نمونه موردمطالعه، ۳۰ درصد جدایه‌ها دارای ژن *mecA* و ۶ درصد ژن *pvl* داشتند. مقاومت به متی سیلین بااتصال به پروتئین PBP2a تغییر می‌کند. PBP2a توسط ژن *mecA* کد

گزاری می‌شود و میل ترکیبی پایینی به β لاکتام‌ها داشته و روی کاست کروموزومی استافیلوکوکوس (*SCCmec*) قرار می‌گیرد (۲۴).

نتایج به‌دست‌آمده بر این نکته تأکید می‌کند که میزان حساسیت یا مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی در نقاط مختلف جغرافیایی جهان متفاوت است و اطلاعات محدودی در مورد میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در برخی از شهرهای ایران وجود دارد. با توجه به کاهش روزافزون حساسیت این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل بهینه در مصرف آن‌ها نقش مهمی در جلوگیری از سوش‌های مقاوم خواهد داشت. عفونت با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بسیار شایع بوده و توکسین‌های تولیدشده توسط این باکتری مشکلات و معضلات فراوانی را در سطح جامعه به وجود می‌آورند و همچنین به دلیل بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیک، درمان آن نیز یکی از مشکلات بهداشتی است. بنابراین ضرورت استفاده از روش‌های تشخیصی مناسب برای شناسایی صحیح عامل عفونت احساس می‌شود، که به تشخیص سریع و کنترل به‌موقع سویه‌های مولد ژن *pvl* و سایر توکسین‌ها، تایپینگ مولکولی سویه‌های MRSA و بررسی وجود ژن‌های دیگر مقاومت در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس MRSA کمک خواهد نمود.

تشکر و قدردانی

از تمامی همکاران گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت (کمیته اخلاق پژوهش به شماره ۱۶۳۳۰۵۰۷۹۴۱۰۲۳) و جناب آقای دکتر امیر منفردان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نمی‌نمایند.

References

1. Steele R. Clinical Handbook of Pediatric infectious Disease. 2th ed. CRC Press; 2013. P.18-26.
2. Malekzadeh F. Microbiology. 5th ed. Tehran. University of Tehran press; 2011. P.24-35. [In Persian]
3. Shorr AF. Epidemiology of Staphylococcal resistance. Clin Infect Dis. 2007; 45(3): 176.
4. Rosseny AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O connell B, Coleman DC. The emetgence and importation of diverse genotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community- acquired MRSA strains in Ireland. J Clin Microbiol. 2007; 45(8): 2554-63.
5. Yanagihara K, Kihara R, Araki N, et al. Efficacy of linezolid againt Panton-Valentine Leukocidin (PVL) – positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse model of haematogenus pulmonary infection. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(5):477-81.
6. Sanchi A, Del Grosso M, Villa L, Ammendolia MG,Superti F, Monaco M, et al. Typing of Panton-Valentine leukocidin-encoding phages carried by methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* from Italy. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(11): 341-6.
7. Colin DA, Mazuri I, Sire S, Finck-Barbancon V. Interaction of the two components of leukcocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. Infect Immun. 1994; 62(8): 3184-3188.
8. Cupane L, Pugacova N, Berzina D, Cauce V, Gardovska D, Miklasevics E. Patients with Panton-Valentine leucocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalization. Int J Mol Epidemiol Genet. 2013; 3(1): 48-55.
9. Rosseny AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leucocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community acquired MRSA strains in Ireland. J Clin Microbiol. 2007; 45(8): 2554-2563.
10. Brown ML, Hara FP, Close NM, Mera RM, Miller LA, Suaya JA. Pervalence and seguence variation of Panton -valentine leucocidin in methicillin- resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the United States. J Clin Microbiol. 2012; 50(1): 86-90.

11. Shakeri F, Golalipour M, Rahimi Alang S Ghaemi EA. *Spa* diversity among MRSA and MSSA strains of *Staphylococcus aureus* in north of Iran. Int J Microbiol. 2010; (2): 351397.
12. Ghaznavi-Rad E, Shamsudin M, Sekawi Z, Vanbelkum A. Multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed Staphylococcal cassette chromosome mec types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Med Microbiol. 2010; 59(10): 1135-1139.
13. Havaei SA, Poursina F, Ahmadpour M, Havaei SR. Detection of Panton-Valentine Leukocidin gene isoforms of *Staphylococcus aureus* isolates in Al-Zahra Hospital, Isfahan-Iran. Advanced Biomedical Research. 2007; (15): 1-4.
14. Malachowa N, Deleo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci. 2010: 19; 28-36.
15. Skov R, Christiansen K, Dancer SJ, Daum RS, Dryden M, Huang YC, *et al*. Update one the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of antimicrobial agents. 2012; 39(3): 193-200.
16. Santosaningish D, Santoso S, Budayanti N, Kuntaman K, Lestari E, Farida H, et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* harboring the *mec*A or Panton-Valentine leucocidin genes in hospitals in Java and Bali, Indonesia. Am Soc of Trop Med Hyg. 2014; 3(4): 728-734.
17. Haghgoo S, Moaddab S,Rafi A. Study of antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* strain isolated from blood cultures in Tabriz Shahid Madani Hospital. J Jundishapour. 2012; 3(2): 383-390. [In Persian]
18. Sun DD, Ma XX, Hu J, Tian Y, Pang L, Shang H, et al. Epidemiological and molecular characterization of community and hospital acquired *Staphylococcus aureus* strains prevailing in Shenyang, Northeastern China. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2013: 17(6); 682-90
19. Orrett FA, Land M. Methicillin-resistant *Sthaphylococcs aureus* prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. BMC Infect Dis 2006; 6(1): 830.
20. Miller L, Remington F, Bayer A, Diep B, Tan N, Bharadwa K. Clinical and epidemiologic characteristics cannot distinguish community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection from methicillin-susceptible *S. aureus* infection: a prospective investigation. Clin Infect Dis. 2007; 44(4):471-482.
21. Darabi N, Habibollahi H, Shahababian K. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* isolated from patient and personal in army hospital. J Army Univ Med Sci IR Iran. 2010: 8(3): 193-9. [In Persian]
22. Hamdan-Partida A, Sainz-Espunes T, Bustos-Martinez J. Isolation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy carriers in a Mexican community. International Journal of Infectious Diseases. 2014; 18: 22-26. 37.
23. Shokoohi S, Abbasi F, Sazgar S, Hajikhani B, Kashi M, Sabeti S, et al. OL-010 Prevalence and risk assessment of CA-MRSA nasal colonization in patients of Longman Hakim Hospital, Tehran, Iran. International Journal of Infectious Diseases. 2011: 15; 818.
24. Moussa I, Hessian A. Rapid detection of community acquired-methicillin resistance *Staphylococcus aureus* recovered from King Saudi Arabia. African Journal of Microbiology Research. 2010: 4(24); 2804-10.
25. Molla-abbaszadeh H, Mobayen H, Mirzaei H. Indentification of Panton- valentine leucocidin (*pvl*) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from ipatients of Emmam Reza and Shohada Hospital of Tabriz by real-time PCR. Iran J Med Microbiol.2013; 6(4): 72-80. [In Persian]
26. Osman N,Instisar IE, Mohamed M, Eragi M, Salih M. Molecular study of Panton-valentine leucocidin gene among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Khartoum State, Sudan.Am J Microbiol Res. 2015; 3(3): 107-111.
27. Cheng FJ, Hiramatsu K, Huang IW, Wang CH, Lauderdale TL. Panton-Valentine Leukocidin (PVL) positive methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: Identification of oxacillin- susceptible *mec*A - positive methicillin-resistant S. aureus. Diagn Microbiol Infect Dis.2009; 65(4):351-7.
28. Moghadam SO, Havaei SA, Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carring panton-valentine leucocidin gene in cutaneous infections in the city of Isfahan. J Med Bacteriol. 2012; 19(2): 9-16.
29. Khosravi AD,Hoveizavi H,Farshadzadeh Z. The prevalence of genes encoding leukocidins in Staphylococcus aureus isolated from ipatients of Emmam Reza and Shohada Hospital of Tabriz by real time PCR. Iran J Med Microbiol.2013; 38(2): 247-251. [In Persian]

30. Motamedi H, Rahmat Abadi S. The Association of panton-valentine leucocidin and *mec*A genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients referred to educational hospital in Ahvaz, Iran. Jundishapur J Microbial. 2015; 8(8): e22021. [In Persian]

Original Article

Prevalence of Methicillin-resistant (MRSA) Gene in *Staphylococcus aureus* Isolates Expressing PantonValentin Leukocidin (*pvl*) Gene Recovered from Clinical Cases in Rasht Hospitals

Pourghafar H[1], Amirmozafari N[2*], Anvari M[3]

1. Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Science Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 25 Apr 2019 Accepted: 16 Nov 2019

Abstract

Background & Objective: Panton-Valentine Leukocidin (PVL) is associated with strains of *Staphylococcus aureus* that produce a high level of virulence which is characterized by skin abscesses and acute necrosis.

Materials & Methods: During a six-month treatment period, a total of 92 clinical isolates of *Staphylococcus* were obtained. Initial tests were performed using the Disk Diffusion Method and Methicillin resistance test determined by an Oxacillin disk. In order to elucidate the frequency detection of *pvl* gene, standard PCR was accomplished using specific primers and then *pvl* positive isolates were further analyzed for the presence of *mec*A gene by the use of specific primers in PCR.

Result: In total, 18 isolates (19.56%) were shown to be positive in terms of their carrying the *pvl* gene among which, 15 isolates (83.33%) were MRSA, 3 (16.66%) were MSSA, and 8 (44.44%) were positive for *mec*A gene.

Conclusion: Despite the existence of *pvl* genes in MRSA isolates, PVL toxin producing strains of *Staphylococcus aureus* are serious threats for health. So, it seems that achieving a rapid and repeatable method for medical center, will help the timely diagnosis and control of PVL- producing strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Panton Valentine Leucocidin, *mec*A, MRSA

***Corresponding Author: Amirmozafari Noor**, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Science Tehran, Iran
Email: amirmozafari@iums.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-5186-8406