مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۶ شماره ۱۰، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۸۰ - ۷۲

تعین وجود ژن پنتون والنتین لکوسیدین (PVL) در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضاء و شهداء تبریز به روش Real-Time PCR

حامد ملاعباس زاده[۱]، هایده مبین[۲*]، حمید میرزایی[۳]

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، دانشکده علوم پایه و پزشکی، گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران
۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، تبریز، ایران
۳- دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و تغذیه، تبریز، ایران
نویسنده رابط: هایده مبین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی.
Email: drhmobaiyen@iaut.ac.ir

چکیده:

زمینه و هدف: *استافیلو کوکوس اورئوس* می تواند توکسین های مختلفی را مانند توکسین آلفا، بتا، گاما، دلتا و لکوسیدین تولید نماید. PVL یک توکسین سلولی می باشد که علیه سلول های پلی مورفونوکلئار، مونوسیت ها و ماکروفاژ ها فعالیت می کند و باعث افزایش قدرت نفوذ پذیری غشاء سلولی و در نتیجه سبب لیز شدن لکوسیت ها و نکروز بافت می شود. این مطالعه در نظر دارد تا میزان شیوع سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* PVL مثبت را با روش Real-Time PCR تعیین نماید.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی که در شش ماهه نخست سال ۱۳۹۰ انجام گرفت، ٤٧ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه های بالینی بیمارستان امام رضاء و ٥٣ سویه از نمونه های بالینی بیمارستان شهداء تبریز جمع آوری شد و با استفاده از پرایمر و پروب های اختصاصی روش Real-Time PCR بر روی آنها انجام گرفت.

یافته ها: از ۱۰۰ سویه مورد بررسی ۱۸ سویه (۱۸ درصد) از نظر وجود ژن PVL مثبت بود که ۱۱ سویه مربوط به سویه های بیمارستان امام رضاء و ۷ سویه مربوط به سویه های بیمارستان شهداء بودند.

نتیجه گیری: با توجه به این که تولید توکسین PVL در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، یک تهدید جدی برای سلامتی انسان ها به حساب می آید، تشخیص سریع و دقیق این ژن در باکتری فوق امری ضروری به حساب می آید. لذا به نظر می رسد که دست یابی به یک روش سریع و تکرار پذیر در مراکز پزشکی به تشخیص سریع و کنترل به موقع سویه های مولد PVL کمک خواهد کرد.

کلمات کلیدی: پنتون والنتین لوکوسیدین، *استافیلوکوکوس اورئوس*، Real-Time PCR

مقدمه:

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت می باشد که از سال های بسیار دور به عنوان یکی از پاتوژن های مهم انسانی شناخته شده است و از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی می باشد که عفونت های ناشی از این باکتری به صورت دائمی و مکرر در بیماران بستری شده روی می دهند (۱و۲) این باکتری سبب ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها از جمله اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک سمی، کورک یا دمل و غیره می شود و می تواند از طریق تماس مستقیم یا از طریق اشیاء منتقل شود (۳و٤).

استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تولید توکسین های مختلفی مانند توکسین آلفا، بتا، گاما، دلتا و لکوسیدین می باشد. در سال های اخیرتوانایی تولید توکسین لکوسیدین مورد توجه محققین قرار گرفته است (۸-۵). زیرا پنتون والنتین لوکوسیدین یک توکسین همولیتیک است که تنها ماکروفاژها و پلی مورفونوکلئرها را مورد حمله قرار می دهد و دارای ۲ جزء پروتینی S (۳۳kDa) و F (۳٤ kDa) که تحت کنترل ژن های *luk* F-PV و *Luk* S-PV می باشد. پروتئین F و S به وسیله الکتروفورز از یکدیگر جدا می گردند و هر یک از آنها به تنهایی غیر فعال هستند، هر دو جزء لکوسیدین آنتی ژنیک بوده و قابل تبدیل به توکسوئید می باشند. این سم با ایجاد مقاومت در مقابل فاگوسیتوز قدرت تهاجمی استافیلوکوک را افزایش می دهد (۱۲-۹). پنتون والنتین لوکوسیدین با ایجاد منفذ در نوتروفیل ها باعث ورود کاتیون ها به درون نوتروفیل شده و در نهایت باعث تخریب آن می گردد. همچنین تنها توکسین استافیلوکوکی که انحصارا روی لکوسیت ها تاثیر دارد؛ پنتون والنتین لوکوسیدین می باشد. لوکوسیدین با تخریب لوکوسیت‌ها و نهایتاً کاهش دادن تعداد لوکوسیت ها در بدن میزبان می‌تواند به عنوان یک شاخص ویرولانس محسوب گردد (۱۳و۱٤). با توجه به این که روش Real-Time PCR به عنوان روش بسیار دقیق و تشخیصی سریع معرفی شده است لذا، این مطالعه در نظر دارد از این روش جهت تعین وجود ژن پنتون والنتین لوکوسیدین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضاء و شهداء تبریز استفاده نماید.

مواد و روش ها:

در این تحقیق برای جمع آوری نمونه در طول مدت ٦ ماه به بیمارستان شهداء و امام رضاء تبریز مراجعه و نمونه های بالینی مختلف (ادرار، خون، ترشحات خلط، CSF، مایع مفصلی و نمونه های اخذ شده از کاتتر و زخم) که از بخش های مختلف بیمارستانی به آزمایشگاه میکروب شناسی ارسال شده بودند، جمع آوری شدند. ابتدا در آزمایشگاه نمونه های فوق روی محیط آگار خون دار، مانیتول سالت آگار مورد کشت میکروبی قرار گرفتند و سپس سویه هایی که مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در محیط ترانسپورت Stuart' s انتقال داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. برای شناسایی گونه های *استافیلوکوکوس* ها و جدا کردن *استافیلوکوکوس اورئوس* از سایر باکتری ها از تست های معمول ارائه شده طبق دستورالعمل CLSI استفاده شد (۱۵). برای بررسی تعین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های مورد مطالعه به روش کربی-باوئر، از آنتی بیوتیک های سفالکسین (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، سفازولین (۳۰ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، کربنی سیلین (۱۰۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم) و متی سیلین (۵ میکروگرم) تهیه شده از شرکت پادتن طب استفاده شد.

برای استخراج DNA ژنومیک ایزوله های جدا شده، از کیت محصول شرکت فرمنتاز (Fermentas) استفاده شد که تمام مراحل استخراج با توجه به دستور عمل کیت انجام گرفت. انتخاب پرایمرهای اختصاصی مورد نیاز در این تحقیق بر اساس مقالات و منابع موجود انتخاب گردید و هومولوژی توالی آن ها با نرم افزار

BLAST مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در این مطالعه از توالی پروب نشاندار FAM-TAMARA استفاده شد. اندازه گیری مواردی از قبیل غلظت پروب و پرایمر با الگو های هر دو روش Primer Express 2.0 و پروتکل Takara Taqman Master Mix با شماره کاتولوگ RR078A بهینه سازی شد (۱۶) (جدول شماره ۱).

جدول ۱: توالی ژن‌های مربوطه و پرایمرها

نوع الیگونوکلئوتید	توالی پرایمر	انطباق با توالی PVL در موقعیت
PVL-FP	5′-GCT GGA CAA AAC TTC TTG GAA-3′	۲۶۶۶_۲۶۹۰
PVL-RP	5′-GAT AGG ACA CCA ATA AAT TCT GGA TTG-3′	۲۷۴۹_۲۷۲۳
PVL-Probe	5′-AAA ATG CCA GTG TTA TCC A- 3'	۲۶۹۴_۲۷۱۲

واکنش های Real-Time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در روتورهای ۷۲ ستونی انجام شدند. مقدار مواد مصرفی واکنش Real-Time PCR شامل Master Mix (Taq Man PCR Master Mix) (۱۲/۵ میکرولیتر)، (DNA ژنومیک) (۶ میکرولیتر)، از هر پرایمر Forward و Reverse اختصاصی ژن های مورد نظر (۰/۵ میکرولیتر)، Probe (۱ میکرولیتر) و آب مقطر (۴/۵ میکرولیتر) تعیین شد و توسط دستگاه Rotor Gene 6000 محصول شرکت Corbett) (Researchواکنش های Real-Time PCR شروع شد.

تنظیم برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در ۳ مرحله و به ترتیب زیر انجام شد:

۱.مرحله اول جهت دناتوره شدن مولکول های DNA و فعال شدن آنزیم پلیمراز به صورت ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه

۲.مرحله دوم ۹۵°C به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۰°C به مدت ۴۰ ثانیه برای ۴۵ سیکل متوالی

۳.مرحله سوم (افزایش دما یا Ramping) از دمای ۵۵°C تا ۹۹°C، با ۱ درجه افزایش در هر مرحله و ۹۰ ثانیه انتظار پیش از ذوب و ۵ ثانیه بعد از ذوب

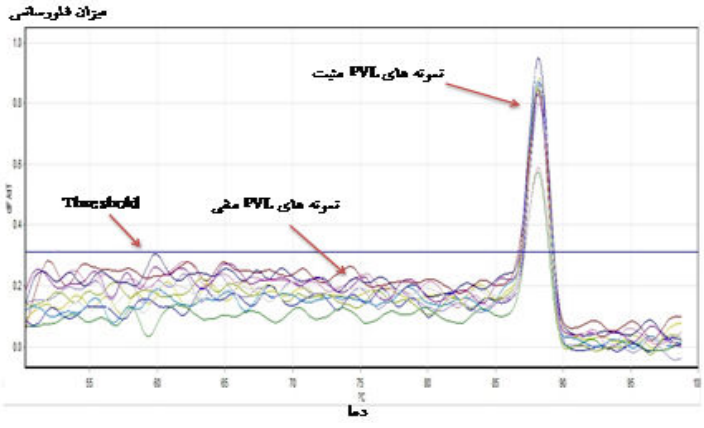
یافته ها:

در این مطالعه، تعداد ۵۳ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* از بیمارستان شهداء و تعداد ۴۷ سویه از بیمارستان امام رضاء جدا شد و کلیه آنها توسط آزمایشات بیوشیمیایی مورد تائید واقع شد. بیشترین سویه جدا شده از بیمارانی با فاصله سنی ۶۰-۵۱ سال، ۲۸ سویه (۲۸٪) و کمترین آن از بیمارانی با فاصله سنی ۲۰-۱۰ سال (۴ سویه) (۴٪) بود. نمونه های مورد مطالعه از نمونه های بالینی مختلف جمع آوری شده بود، بیشترین سویه جدا شده *استافیلوکوکوس اورئوس* از خون (۳۰ سویه) (۳۰٪) و کمترین آن از نمونه حاصل از کاتتر (۲ سویه) (۲٪) بود. نتایج به دست آمده از آزمایش آنتی بیوگرام در دو بیمارستان امام رضاء و شهداء تبریز در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

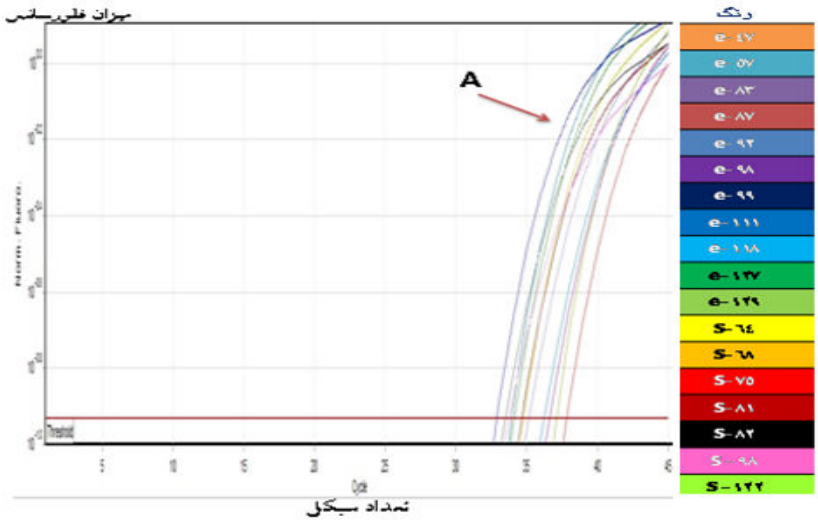
جدول ۲: نتایج آنتی بیوگرام سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از بیمارستان های امام رضاء و شهداء تبریز

نام آنتی بیوتیک	علامت اختصاری	غلظت دارو بر حسب میلی گرم	بیمارستان امام رضاء و شهداء تبریز					
			حساس		مقاوم		بینابینی	
			تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کوتریموکسازول	STX	۲۵	۷٤	۷٤	۱٦	۱٦	۱۰	۱۰
تتراسایکلین	TE	۳۰	٤۲	٤۲	٤٤	٤٤	۱٤	۱٤
سیپروفلوکساسین	CP	۵	٦۷	٦۷	۱۲	۱۲	۲۱	۲۱
جنتامایسین	GM	۱۰	٦۹	٦۹	۲۰	۲۰	۱۱	۱۱
کربنی سیلین	CB	۱۰۰	۷۳	۷۳	۲۰	۲۰	۷	۷
اگزاسیلین	OXA	۱	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰
کلیندامایسین	CC	۲	٦۳	٦۳	۱۵	۱۵	۲۲	۲۲
سفالکسین	CZ	۳۰	٦۱	٦۱	۳۰	۳۰	۹	۹
سفازولین	CN	۳۰	۵۹	۵۹	۲۹	۲۹	۱۲	۱۲
متی سیلین	ME	۵	٤	٤	۹۱	۹۱	۵	۵

از مجموع ۱۰۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی، ۱۱ سویه (۲۳/٤۰٪) از سویه های جدا شده از بیمارستان امام رضاء و ۷ سویه (۱۳/۲۰٪) از سویه های جدا شده از بیمارستان شهداء از نظر وجود ژن پنتون والنتین لوکوسیدین مثبت گزارش شده اند. همچنین سویه های پنتون والنتین لوکوسیدین مثبت در مرحله اول آزمایش، در مراحل بعدی آزمایش به عنوان کنترل مثبت، مجددا مورد آزمایش قرار گرفتند و برای انجام مراحل Real-Time PCR منحنی ذوب (Dissociation Curve)، جهت تعیین تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم وجود جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی، برای هر واکنش تکثیری تعیین شد و دمای ذوب DNA در دمای ۸۵-۹۰°C حاصل شد (شکل شماره ۱) تعیین بهترین دمای ذوب برای سویه های مورد آزمایش و در شکل شماره (۲) نتایج حاصل از Real-Time PCR سویه های مورد آزمایش نشان داده شده است.



شکل ۱: نتایج به صورت منحنی تفکیک (ذوب) بدست آمده از Real-Time PCR بر اساس دما و مشتق سیگنال فلورسنت دریافتی از دستگاه Real-Time PCR در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیمارستان امام رضاء و شهداء تبریز، تمام نمونه های مورد آزمایش در فاصله دمایی ۸۵-۹۰° C در مقایسه با خط آستانه (Threshold) بهترین شرایط دناتوراسیون DNA را نشان دادند.



شکل ۲: نتایج بدست آمده از Real-Time PCR بر اساس تعداد سیکل و مشتق سیگنال فلورسنت دریافتی. A: هر یک از رنگ ها نمایانگر نمونه های PVL مثبت بوده و در سمت راست رنگ و شماره سویه های PVL مثبت نشان داده شده است.

بررسی نتایج بدست آمده نشان می دهد بیشترین سویه های PVL مثبت مربوط به سویه های جدا شده از خون با ٦ مورد (۳۳/۳۲٪) و ادرار با ٤ مورد (۲۲/۲۲٪) می باشد و در نمونه های جدا شده از ترشحات بینی، تراشه، آبسه و کاتتر سویه PVL مثبت مشاهده نشد. همچنین ۱۵ سویه (۸۳/۳۱٪) PVL مثبت جدا شده از مردان و ۳ سویه (۱٦/٦٥) PVL مثبت جدا شده از زنان بوده است (جدول شماره ۳).

جدول ۳: توزیع فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* PVL مثبت جدا شده از بیمارستان امام رضاء و شهداء تبریز به تفکیک نوع نمونه و جنسیت

نوع نمونه مورد آزمایش	تعداد سویه های پنتون والنتین لکوسیدین مثبت جدا شده از بیمارستان		جنس بیمار			
			زن		مرد	
	امام رضاء	شهداء	تعداد	درصد	تعداد	درصد
خون	٤	۲	۱	۵/۵۵	۵	۲۷/۷۷
زخم	۱	۱	۰	۰	۲	۱۱/۱۱
ترشحات بینی	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مایع مغری نخاعی	۲	۱	۱	۵/۵۵	۲	۱۱/۱۱
تراشه	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گلو	۱	۰	۰	۰	۱	۵/۵۵
ادرار	۲	۲	۰	۰	٤	۲۲/۲۲
ابسه	۰	۰	۰	۰	۰	۰
کاتتر	۰	۰	۰	۰	۰	۰
خلط	۱	۱	۱	۵/۵۵	۱	۵/۵۵
جمع	۱۱	۷	۳	۱٦/٦٥	۱۵	۸۳/۳۱

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های PVL مثبت با سویه های PVL منفی در هر دو بیمارستان امام رضاء و شهداء تبریز با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و با آزمون مجذور خی، مورد بررسی قرار گرفت و مقاومت نسبت به سفالکسین در سویه های PVL مثبت و سویه های PVL منفی با هم متفاوت و دارای اختلاف معنی دار یعنی P کمتر یا مساوی ۰/۰۵ بودند (جدول شماره ٤).

جدول ٤: مقایسه میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* PVL مثبت با سویه های PVL منفی

آنتی بیوتیک	سویه های PVL مثبت ۱۸/۱۰۰			سویه های PVL منفی ۸۲/۱۰۰			مقدار P
	درصد			درصد			
	حساس	بینابینی	مقاوم	حساس	بینابینی	مقاوم	
کوتریموکسازول	٦٦/۷	۱٦/۷	۱٦/۷	۷٥/٦	۸/٥	۱٥/۹	۰/٥٦٥
تتراسایکلین	۳۸/۹	٥/٦	٥٥/٦	٤۲/۷	۱٥/۹	٤۱/٥	۰/٤
سیپروفلوکساسین	۸۳/۳	٥/٦	۱۱/۱	٦۳/٤	۲٤/٤	۱۲/۲	۰/۱۸٤
جنتامایسین	۷۲/۲	۱٦/۷	۱۱/۱	٦۱/۰	۱٤/٦	۲٤/٤	۰/٤٦۸
کربنی سیلین	۷۲/۲	۱۱/۱	۱٦/۷	۷۲/۲	۱٦/۷	۱۱/۱	۰/۷۲۱
اگزاسیلین	۰	۰	۱۰۰	۰	۰	۱۰۰	–
کلیندامایسین	٦٦/۷	۱٦/۷	۱٦/۷	٦۲/۲	۲۳/۲	۱٤/٦	۰/۸۳۱
سفالکسین	۱٦/۷	٥/٦	۷۷/۸	۷۰/۷	۹/۸	۱۹/٥	۰/۰۱
سفازولین	٤٤/٤	۳۳/۳	۲۲/۲	٥۰/۰	۱۷/۱	۳۲/۹	۰/۲۷٤
متی سیلین	٥/٦	۰.	۹٤/٤	۳/۷	٦/۱	۹۰/۲	۰/٥۳۳

بحث:

از آن جائی که عفونت با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار شایع بوده و توکسین های تولید کننده این باکتری مشکلات و معضلات فراوانی را در سطح جامعه به وجود می آورد و همچنین بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی آن را به یک معضل در درمان تبدیل نموده است لذا ضرورت دارد با استفاده از روش‌های تشخیصی مناسب، عامل عفونت به درستی شناسایی گردد پس انجام مطالعات مولکولی می‌تواند در این زمینه بسیارکمک کننده باشد.

به نظر می رسد که دست یابی به یک روش سریع و تکرار پذیر در مراکز پزشکی به تشخیص سریع و کنترل به موقع سویه های مولد حضور ژن پنتون والنتین لکوسیدین (*pvl*) و سایر توکسین های مولد این باکتری کمک خواهد کرد و با توجه به این که در جامعه آزمایشگاهی ایران تکنیک هایی چون Real Time PCR در آزمایشگاه های تشخیص طبی به علت هزینه های بالای آن رایج نبوده، با راه اندازی این تکنیک می توان به کلنیسین ها در تشخیص سریع و بسیار دقیق کمک شایانی نمود. به نظر میرسد که انجام تحقیق مشابه در سویه های جدا شده از سایر نقاط کشور، امکان بررسی وجود یا عدم وجود ژن پنتون والنتین لکوسیدین (*pvl*)، اندیس مناسبی برای بررسی پراکندگی جغرافیایی این سویه ها میتواند باشد.

در سال ۲۰۱۰ هوایی و همکاران در ایران شیوع ژن‌های کدکننده لکوسیدین را در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بررسی کردند. آن‌ها ۱٤۹ نمونه بالینی شامل نمونه‌های پوستی، تراشه، خون و ادرار را مطالعه کردند و نشان دادند که بیش از ۹٤٪ سویه‌های PVL مثبت، مربوط به عفونت‌های پوستی و تراشه، خون و ادرار بوده است. نتایج بدست آمده در این

تحقیق نشان می دهد ۵۵/۵٪ PVL مثبت مربوط به خون و ادرار است و هیچ مورد PVL مثبت در سویه های جدا شده از تراشه مشاهده نشد (۱۷).

رود و همکاران در سال ۲۰۰٤ با مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش Real-Time PCR نشان دادند، ژن *pvl* در ۵۱ مورد منفی می باشد (۵۸٪ PVL منفی MSSA و ٤۲٪ PVL منفی MRSA) و ٤۹ مورد PVL مثبت (٤٦٪ PVL مثبت MSSA و ٥٤٪ PVL مثبت MRSA) می باشد که این نتایج با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت نداشت زیرا از ۱۰۰ سویه مورد مطالعه ۱۸ سویه (۱۸٪) PVL مثبت (۹٤/٤٪ MRSA و ٥/٦٪ MSSA) بودند و ۸۲ سویه (۸۲٪) PVL منفی (۹۰/۲٪ MRSA و ۳/۷٪ MSSA) بودند (۱٦).

در سال ۲۰۰٦، در مطالعه‌ای که در انگلستان صورت گرفت نشان داده شد که کمتر از ۲٪ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حامل ژن *pvl* هستند و این ژن می‌تواند هم در سویه‌های MRSA و هم MSSA حمل شود که این نتایج با مطالعه کنونی مطابقت داشت، زیرا ٥/٦٪ سویه های PVL مثبت MSSA و ۹٤/٤٪ سویه های PVL مثبت MRSA بودند (۱۸).

هوایی و همکاران نشان دادند که سویه‌های MRSA و PVL مثبت فقط از نمونه‌های اکتسابی از جامعه به دست نمی‌آیند و در سویه‌های اکتسابی از بیمارستان هم بدست می آید، نتایج حاصل از این مطالعه روی سویه های اکتسابی از بیمارستان این نظر را تایید می کند (۱۷).

در مطالعه ای که پوربابایی و همکاران در سال ۱۳۸٦ با عنوان بررسی وضعیت انتشار *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک در اتاق عمل بیمارستان گلپایگانی شهر قم انجام دادند، مقاومت نسبت به سفازولین را ۲۲/۱۸٪ گزارش دادند که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر که ۲۹٪ مشاهده شد مطابقت دارد (۱۹). در مطالعه ی اکبر زاده خیاوی و همکاران در سال ۱۳۸٦ در بیمارستان های شهر تبریز انجام دادند میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین را ۱۰٪ گزارش نمودند که نشان دهنده مشابهت نتایج مطالعه آنها با نتایج حاصله از مطالعه حاضر است، زیرا در مطالعه کنونی (۱۲٪) گزارش شد (۲۰).

در مطالعه ای که توسط دارابی و همکاران در سال ۱۳۸۹ با عنوان ویژگی های مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران و پرسنل بیمارستانی ارتش: بررسی مقاومت به متی سیلین انجام گرفت، گزارش کردند که ۹۰٪ سویه ها مقاوم به متی سیلین و ۲۵٪ سویه ها نسبت به کلیندامایسین مقاوم هستند، که این نتایج با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت داشت، زیرا در مطالعه کنونی ۹۱٪ سویه ها نسبت به متی سیلین مقاوم و ۱۵٪ نسبت به کلیندامایسین مقاوم بودند (۲۱).

در مطالعه ای که توسط سلطان دلال و همکاران در سال ۱۳۸۸ با عنوان جدا سازی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سلین از مواد غذایی در تهران انجام گرفت، گزارش کردند که میزان مقاومت به متی سلین ۲٪، کلیندامایسین ٤٪، سیپروفلوکساسین ۱/٦٪ و تتراسایکلین ٤/۲۲٪ می باشد. با توجه به محل جدا سازی سویه ها این نتایج با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت نداشت (۲۲). با توجه به این که همه مراحل کار بصورت دقیق و کنترل شده انجام گردیده است به نظر نمی آید این تفاوت مربوط به تکنیک کار باشد و ممکن است به منطقه جغرافیائی و یا نوع نمونه اخذ شده غیره ارتباط داشته باشد و بهر حال لازم است در این خصوص بررسی های بیشتر انجام شود. نتایج بدست آمده بر این نکته تاکید می کند که میزان مقاومت یا حساسیت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد مصرف در نقاط مختلف جغرافیایی در جهان متفاوت می‌باشد. با این وجود باید در تجویز این آنتی‌بیوتیک ها توسط پزشکان نهایت دقت را به عمل آورد زیرا مقاومت حدواسط در این سویه‌ها اعلام خطری برای شیوع سویه‌های مقاوم می‌باشد.

نتیجه گیری:

از آن جائی که عفونت با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار شایع بوده و توکسین های تولید کننده این باکتری مشکلات و معضلات فراوانی را در سطح جامعه به وجود می آورد و همچنین بروز مقاومت‌های

آنتی‌بیوتیکی آن را به یک معضل در درمان تبدیل نموده است لذا ضرورت دارد با استفاده از روش‌های تشخیصی مناسب، عامل عفونت به درستی شناسایی گردد پس انجام مطالعات مولکولی می‌تواند در این زمینه بسیارکمک کننده باشد. به نظر می رسد که دست یابی به یک روش سریع و تکرار پذیر در مراکز پزشکی به تشخیص سریع و کنترل به موقع سویه های مولد حضور ژن پنتون والنتین لکوسیدین و سایر توکسین های مولد این باکتری کمک خواهد کرد و با توجه به این که در جامعه آزمایشگاهی ایران تکنیک هایی چون Real Time PCR در آزمایشگاه های تشخیص طبی به علت هزینه های بالای آن رایج نبوده، با راه اندازی این تکنیک می توان به کلنیسین ها در تشخیص سریع و بسیار دقیق کمک شایانی نمود. پیشنهاد می شود با مطالعات بیشتر در مراکز تحقیقاتی کشورمان بتوان گام های اساسی در این زمینه برداشت.

تشکر و قدردانی:

از مسئولین محترم دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز که زمینه انجام این تحقیق را فراهم نمودند و نیز از مسئولین محترم آزمایشگاه تشخیص طبی پلاسما تبریز و پرسنل محترم بیمارستان امام رضاء و بیمارستان شهداء تبریز که با فراهم نمودن وسایل و تجهیزات لازم نویسندگان این مقاله را یاری نمودند؛ نهایت تقدیر و تشکر را دارم.

فهرست مراجع:

1) Beam JW, Buckley B. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: prevalence and risk Factors. *J Athl Train* 2006; **41**(3): 337-340.

2) Marjolein F Q, Vandenbergh ED P, Yzerman F, Alex V, Helene A, Boelens M, *et al.* Follow-up of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. *J clin Microbiol* 1999; **37**(10): 3133-3140.

3) Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Emerg Infect Dis* 2001; **7**(2): 323-326.

4) Treakle AM, Thom KA, Furuno JP, *et al.* Bacterial contamination of health care workers' white coats. *Am J Infect Control* 2009; **37**(2): 101-105.

5) Schlebusch S, Schooneveldt J M, Huygens F. Prevalence of *Staphylococcus aureus* Strains in an Australian Cohort, 1989–2003: Evidence for the Low Prevalence of the Toxic Shock Toxin and Panton-Valentine Leukocidin Genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; **28**(10): 1183-1189.

6) Clark J. A brief review of Panton-Valentine Leukocidin Producing *staphylococcal* Infections in the Intensive Therapy Unit. *J Current Anaesthesia & Critical Care* . 2008; **19**(5): 330-332.

7) Christiane W, Wolfgang W, Christiane G. Insertion of Host DNA into PVL-Encoding Phages of the *Staphylococcus aureus* Lineage ST80 by Intra-Chromosomal Recombination. *J Virol* 2010; **406** (2): 322-327.

۸) ملاعباس زاده ح، مبین ه، میرزایی ح، منفردان ا، شهیرفر ح، سفیدی هریس ی. تعین وجود ژن لکوسیدین پنتون والنتین (PVL) در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضاء تبریز به روش Real-Time PCR. خلاصه مقالات چهارمین کنگره آزمایشگاه و بالین، دانشگاه بهشتی تهران، ۱۳۹۰ ص ۱۳۰.

9) Sachiko N, Jun K, Jun-ichi C, Yves P, Sophie J, Jerome E, *et al.* Phage Conversion of Panton-Valentine Leukocidin in *Staphylococcus aureus*. Molecular Analysis of a PVL-Converting Phage, Fslt. *J Gene* 2001; **268**(1-2): 195-206.

10) Molla-abbaszadeh H, Mobaiyen H, Mirzaei H, Monfaredan A , Shahirfar H. Identification of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients of Shohada Hospital of Tabriz by Real-Time PCR. Book of Abstracts 20 th Iranian Congress on Infectious Diseases and Tropical Medicine. Tehran Des 31. 2011-Jan 4. 2012; P 163.

11) Morgan M S. Diagnosis and Treatment of Panton-Valentine Leukocidin (PVL)- Associated *staphylococcal pneumonia*. *J of Antimicrob Agents* 2007; **30** (4): 289-296.

12) Ryan R, Nick A, Toni H, Laelie A S, Evelyn N, Michael R M, *et al*. Development of a Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of Panton-Valentine Leukocidin Toxin Genes in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J clin Microbiol* 2005; **43**(12): 6147-6149.

13) Vandenesch F, Naimi T, Enright M C, Lina G, Nimmo G R, Heffernan H, *et al*. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton–Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *J Emerg Infect* 2003; **9**(8): 978-984.

14) Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J C, Lina G, Bes M, *et al*. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton–Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *J Lancet* 2002; **359**(9308): 753-759.

15) Clinical and laboratory standards institute (CLSI), 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne, Pa. M100-S16, 26, no. 3. 2006.

16) Ruu H D, Cornelis V, Christel D, Michele B, Nancy L, Etienne E E, Stobberingh A. Rapid Detection of Panton-Valentine Leukocidin from Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Strains by Real-Time PCR. *J FEMS Microbial Letters* 2004; **240**(2): 225-228.

17) Havaei SA, Ohadian Moghadam S, Pourmand MR, Fghri J. Prevalence of genes encoding bi-component leukocidins among clinical isolates of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *J Publ Health* 2010; **39** (1): 8-14.

18) Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy ME, et al. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *J Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**(4): 1515-1519.

۱۹) پوربابایی ا ع، امیر خانی ع. بررسی وضعیت انتشار *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک در اتاق عمل بیمارستان گلپایگانی شهر قم. *مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی* ۱۳۸٦، سال۱۷ شماره ۱، صص ۳۷ تا ٤۰.

۲۰) اکبرزاده خیاوی ت، نهایی م, رحمتی ا, اصغرزاده م, صادقی ج. تعیین الگوی پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ناقلین بینی در بیماران دیالیزی مرکز آموزشی و درمانی امام خمینی تبریز. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل* ۱۳۸٦، سال ۷ شماره ۱، صص ۷ تا ۱٤.

۲۱) دارابی ن، حبیب الهی ه، شهابیان ک. ویژگی های مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران و پرسنل بیمارستانی ارتش: بررسی مقاومت به متی سیلین. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران* ۱۳۸۹، سال ۸ شماره ۳، صص ۱۹۳ تا ۱۹۹.

۲۲) سلطان دلال م م، پناهی ع، صابرپور ف، فاضلی فرد پ، طباطبایی بفرویه ا، فخاریان ف و همکاران. جدا سازی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سلین از مواد غذایی در تهران. *مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی* ۱۳۸۸، سال ۱ شماره ۲، صص ۱ تا ۹.