Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Adhesion Factors and Association with Antibiotic Resistance among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*

Hamid Motamedi[1], Babak Asghari[1], Hamed Tahmasebi[2], Mohammad Reza Arabestani[1,3]

1. Department of Microbiology, School of Medicine, University of Hamadan, Hamadan, Iran
2. Department of Microbiology, School of Medicine, University of Zahedan, Zahedan, Iran
3. Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2017/05/16
Accepted: 2017/07/31
Available online: 2017/08/08

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(3): 27-36

Corresponding author:

Dr. Mohammad Reza Arabestani

Department of Microbiology, School of Medicine, University of Hamadan, Hamadan, Iran

Tel: 098813838077

Email:
mohammad.arabestani@gmail.com

Abstract

Background and Aims: *Staphylococcus aureus* adhesion factors can reinforce the pathogenicity of the bacteria. The aim of this study was to identify adhesion factors among clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus* and determine the association between these factors and antibiotic resistance patterns.

Materials and Methods: In an analytical study from October 2016 to April 2017, 302 clinical isolates of *S. aureus* were confirmed by biochemical tests. Methicillin-resistant strains were determined by phenotypic methods. Multiplex PCR method was used to identify adhesion factors. In this way, *bbp*, *cna*, *eno* and *ebpS* genes were identified among different isolates.

Results: A total of 302 clinical isolates of *S. aureus* were isolated from different clinical samples including wound, blood, urine, trachea, catheter, swabs. Of 302 isolates, 123 were methicillin resistant and 73.53% and 75.7% of the isolates were resistant to erythromycin and penicillin, respectively. The incidence of resistance genes among among methicillin resistant *S. aureus* isolates were as follows: *bbp* (10 isolates: 6.89%), *cna* (6 isolates: 13.4%), *eno* (28 isolates: 19.31%) and *ebpS* (19 isolates: 13.1%),. There was a significant correlation between the antibiotic resistance patterns and the frequency of adhesion factors ($P \leq 0.05$).

Conclusions: According to the results, there was a significant correlation between adhesion factors and antibiotic resistance among methicillin-resistant isolates of *S. aureus.*

KeyWords: Antibiotice Resistance, Methicilin Resistance of *Staphylococcus aureus*, Adhesion factors

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Motamedi H, Asghari B, Tahmasebi H, Arabestani MR. Adhesion Factors and Association with Antibiotic Resistance among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* . Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (3): 27-36

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۳ – مرداد و شهریور ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

شناسایی عوامل چسبندگی درجدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و تعیین ارتباط حضور این عوامل با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

حمید معتمدی[۱]، بابک اصغری[۱]، حامد طهماسبی[۲]، محمدرضا عربستانی[۱و۳]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۳. مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۶
پذیرش:۱۳۹۶/۰۵/۰۹
انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۵/۱۷
موضوع:
باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(3): 27-36

نویسنده مسئول:
دکتر محمدرضا عربستانی

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تلفن: ۰۹۸۸۱۳۸۳۸۰۷۷

پست الکترونیک:
mohammad.arabestani@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: عوامل چسبندگی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین توسط ژن‌های خاصی کد می‌شوند که می‌توانند باکتری را در مسیر بیماری‌زایی تقویت بکنند. هدف از این پژوهش شناسایی عوامل چسبندگی در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و تعیین ارتباط حضور این عوامل با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی است.

مواد و روش کار: در یک مطالعه تحلیلی از مهرماه سال ۱۳۹۵ تا اردیبهشت سال ۱۳۹۶، ۳۰۲ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی اولیه شناسایی شدند. سپس، سویه‌های مقاوم به متی سیلین توسط روش‌های فنوتیپی تعیین شدند. برای شناسایی حضور ژن‌های کد کننده عوامل چسبندگی شامل *bbp ،can ،eno ،ebpS*. از روش Multiplex PCR استفاده شد. همچنین، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون تست کای-دو جهت تحلیل‌های آماری استفاده شد.

یافته‌ها: از ۳۰۲ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*، جداشده از نمونه‌های مختلف زخم، خون، ادرار، تراشه، کاتتر، سواپ و بیماران سرپایی به دست آمد. از این میان، ۱۲۳ جدایه دارای مقاومت به متی سیلین بودند. همچنین، مقاومت نسبت به اریترومایسین و پنی‌سیلین با ۷۳/۵۳ درصد و ۷۵/۱ درصد در بین جدایه ها، بیشترین فراوانی را داشتند. در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین حضور ژن‌های عامل چسبندگی برای ژن *bbp* در ۱۰ جدایه (۶/۸۹٪)، *cna* در ٦ جدایه (٤/۱۳٪)، ژن *eno* در ۲۸ جدایه (۱۹/۳۱٪) و *ebpS* در ۱۹ جدایه (۱۳/۱٪) مشاهده شد. ارتباط معنی‌داری بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فروانی ژن‌های عامل چسبندگی مشاهده شد ($P\leq0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، ارتباط معنی‌داری بین حضور گروه‌های ژنی عوامل چسبندگی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک در جدایه های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین مشاهده شد.

کلمات کلیدی: مقاومت دارویی، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، عوامل چسبندگی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

در سال ۱۹۴۰ پنی‌سیلین یکی از مؤثرترین داروهای ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* بود تا اینکه از سال ۱۹۵۲ مقاومت به این آنتی‌بیوتیک ۷۰ تا ۸۰ درصد افزایش پیدا کرد (۱). مقاومت به پنی‌سیلین در سال ۱۹۶۱ به‌طور کامل گسترش پیدا کرد و تا جایی پیش رفت که *استافیلوکوکوس اورئوس* علاوه بر پنی‌سیلین به داروهای دیگری ازجمله متی سیلین، نفی سیلین و اگزاسیلین و طیف گسترده ایی از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی وسیع الطیف، مقاوم شد (۲). دراین‌بین مقاومت به متی سیلین چالش جدیدی را به علم پزشکی معرفی کرد که ماحصل آن ظهور سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین بود (۳).

متی سیلین ازجمله آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی می‌باشد که بااتصال به PBPs باعث مهار ترانس پپتیدازها، ممانعت از ساخت پپتیدوگلیکان باکتری و به دنبال آن تخریب دیواره سلولی می‌شود و درنهایت مرگ باکتری را در پی دارد (۴). حضور ژن *mecA* منجر به ظهور*استافیلوکوکوس اورئوس* های مقاوم به متی سیلین می‌شود (۵). ژن *mecA* بر روی یک عنصر ژنتیکی جابجا شونده ژنتیکی قرار دارد که به آن کاست کروموزومی *mec* استافیلوکوکی (*Staphylococcus* Casset Cromosom mec) می‌گویند (۶).

اجزای سطحی *استافیلوکوکوس* به دلیل نقش مؤثر خود در اتصال باکتری، اهمیت زیادی را در استقرار اولیه ارگانیسم‌ها در میزبان بر عهده‌دارند. *استافیلوکوکوس* های کپسول دار به‌واسطه کپسول در برابر تهاجم وابسته به کمپلمان میزبان، محافظت می‌شوند و به‌سرعت در بافت‌های میزبان انتشار می‌یابند (۷). اگزوپلی ساکارید ممکن است یک فاکتور سرنوشت‌ساز در موفقیت ارگانیسم برای لانه گزینی در اعضای مصنوعی از قبیل دریچه‌های قلب و یا کاتتر های داخل وریدی باشد(۸،۹). انجام شدن این اتصالات ضعیف تا قوی وابسته به خانواده‌ای از پروتئین‌ها تحت عنوان اجزا سطحی میکروبی شناسایی کننده مولکول‌های چسبنده ماتریکس (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) صورت می‌گیرد(۱۰). دراین‌بین، حضور پیوند کووالانسی بین پروتئین‌های عامل چسبندگی و پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری، قدرت اتصال باکتری را به میزان بسیار قابل‌ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد. برای انجام شدن موارد ذکرشده، نیاز به پروتئین‌های خاصی می‌باشد که زمینه ایجاد فاکتورهای چسبندگی را فراهم کنند. این پروتئین‌ها شامل پروتئین متصل شونده به کلاژن (*Cna*)، پروتئین متصل شونده به فیبرینوژن (*FbBP*)، پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین (*FnBP*) و پروتئین متصل شونده به الاستین (*EbpS*) می‌باشند (۱۱). البته در ایجاد این فاکتورهای چسبندگی عوامل دیگری نیز دخیل می‌باشند، که موارد ذکرشده از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند (۱۱).

این احتمال می‌رود که سویه‌های دارای مقاومت چندگانه (MDR) *استافیلوکوکوس اورئوس* که علاوه بر پنی‌سیلین و متی سیلین به برخی آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف مقاوم شده‌اند، عناصر ژنی را توسط کاست ژنی *SCCmec* منتقل کنند که علاوه بر ایجاد مقاومت، می‌تواند ژن‌های عامل چسبندگی را نیز بین سویه‌های حساس منتقل کند. به‌این‌ترتیب وقتی سویه‌های حساس ژن‌های مقاومت را دریافت می‌کنند، زمینه برای دریافت ژن‌های تولید عوامل چسبندگی هم آماده می‌شود و در کنار مقاومت آنتی‌بیوتیکی، قادر به ایجاد بیماری‌های پوستی شدیدی هم می‌شوند (۱۴-۱۲). در این میان، پروتئین‌های متعددی در پستانداران وجود دارند که می‌توانند به‌طور اختصاصی به *استافیلوکوکوس اورئوس* اتصال یابند. این مسئله، پیشنهاد می‌کند که بیش از یک ژن کد کننده عامل چسبندگی وجود دارد. حداقل یکی از این ژن‌ها، بر روی پلاسمید قرارگرفته است. اگر ژن‌های عامل چسبندگی بر روی پلاسمید قرار داشته باشند، می‌توانند به‌سادگی در میان سوش های مختلف جابجا شوند و شاخص‌های بیماری‌زایی را در میان سوش های *استافیلوکوکوس* پخش نمایند، این ویژگی چگونگی تنوع وسیع در توانایی بالقوه بیماری‌زایی را توصیف می‌کند (۷). ازاین‌رو، هدف از این مطالعه شناسایی عوامل چسبندگی در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و تعیین ارتباط حضور این عوامل با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تعیین شد تا در کنار شناسایی سویه‌های دارای تهاجم بیشتر، با در نظر گرفتن الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، احتمال ارتباط بین حضور ژن‌های عامل چسبندگی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی موردبررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، که با استفاده از روش نمونه‌گیری آسان و در دسترس صورت گرفت، طی یک دوره ۱۱ ماهه، ۳۰۲ نمونه بالینی شامل خون، ادرار، کاتتر، سواب بینی، زخم، ترشحات، تراشه، خلط، بزاق و سایر موارد، از بیماران بستری در بخش‌های مختلف به مراکز منتخب درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر همدان در سال ۱۳۹۵ در ماه‌های خرداد تا دی‌ماه جمع‌آوری شد. معیار ورود به مطالعه بیماران بستری در بیمارستان و مشکوک به عفونت باکتریایی و معیار خروج از مطالعه، بیماران فاقد علائم باکتریایی و عفونی تعیین گردید. نمونه‌های به‌دست‌آمده بر روی محیط پایه Blood Agar (Merck آلمان) غنی‌شده با ۵ درصد خون تازه گوسفندی (sinapooyesh ایران) به‌صورت خطی کشت داده‌شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از مشاهده کلنی‌ها، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، کوکسی های گرم مثبت جداسازی شدند. از تست کاتالاز برای

تفریق استافیلوکوک ها از استرپتوکوک ها استفاده شد. جهت تشخیص استافیلوکوک ها از میکروکوک ها آزمایش اکسیداتیو/فرمانتیو مورداستفاده قرار گرفت. برای تفکیک استافیلوکوک های کواگولاز مثبت از استافیلوکوک های کواگولاز منفی از تست کواگولاز لوله ای استفاده شد(۱۶، ۱۵).

در ابتدا برای تعیین حساسیت جدایه های بالینی از ۱۰ آنتی‌بیوتیک شامل دیسک‌های، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، اگزاسیلین (۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحدی)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرمی)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرمی)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرمی)، سفازولین (۳۰ میکروگرمی)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرمی)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرمی) (Mast انگلستان) با روش Kirby-Bauer Disk Diffusion استفاده گردید. برای این کار ابتدا کلنی‌های جداسازی شده از باکتری‌های به‌دست‌آمده بعد از تهیه سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی و تهیه رقت نیم مک فارلند، به‌صورت چمنی بر روی محیط‌های MHA (Merck آلمان) باضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شدند. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با استفاده از دستگاه دیسپنسر (Mast انگلستان) بر روی محیط قرار داده شدند. مقاومت به متی سیلین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین (۳۰ میکروگرمی) (Mast انگلستان) و نوارهای E-test سفوکسیتین (Liofilchem ایتالیا) تعیین شد. جهت قرار دادن نوارهای E-test نیز از یک پنس استریل کنار شعله استفاده گردید. سپس محیط‌های کشت، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵±۲ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از آخرین نسخه CLSI مورد ارزیابی قرار گرفت. برای کنترل کیفی و ارزیابی نتایج، از *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 به‌عنوان کنترل منفی و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC43300 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۷).

برای انجام استخراج DNA ژنومیک مراحل اولیه به‌صورت زیر انجام شد. ابتدا از جدایه های بالینی تأییدشده با آزمایش‌های بیوشیمیایی، ذخیره‌شده در ۲۰- درجه سلسیوس، روی محیط پایه Blood agar (Merck آلمان) حاوی ۵ درصد خون گوسفند، ساب کالچر تهیه شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس یک کلنی از هر جدایه کشت داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (Merck آلمان) که قبلاً درون لوله‌های درب دار شیشه ایی به تعداد جدایه ها تقسیم و شماری گذاری شده بودند، تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت انکوبه گردید. ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های درب دار ریخته شد و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن ایران بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. DNA به‌دست‌آمده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای انجام آزمون‌های مولکولی، ذخیره شد (۱۶).

پرایمرهای تهیه‌شده از شرکت ماکروژن به سفارش پیشگام ایران برای شناسایی ژن‌های *cna*، *bbp*، *eno*، *ebpS* و *mecA* مورداستفاده قرار گرفت (جدول ۱). مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix (Ampliqon آلمان) شامل Mgcl2 , Tris-Hcl PH8.5, (NH_4) SO_4, 3mM dNTP 0.4Mm, 0.2%Tween20 0.2 unit Ampliqon (Insert red dye and stabilizer, polymeras, بود. آب مقطر دیونیزه جهت تنظیم حجم در ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. در این مطالعه از پرایمرهای زیر جهت بررسی‌های مولکولی استفاده شد.

جدول ۱: لیست پرایمرهای مورداستفاده جهت شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس* مقاوم به متی سیلین و دارای فاکتورهای چسبندگی

ژن‌های موردنظر	طول توالی	اندازه (bp)	رافرنس
bbp	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT	۵۷۵	۱۸
cna	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	۴۲۳	۱۷
ebpS	ACGTGCAGCAGCTGACT CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	۱۸۶	۱۷
mecA	CATCCAGAACCAATCGAAGAC CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTG	۵۴۴	۱۷

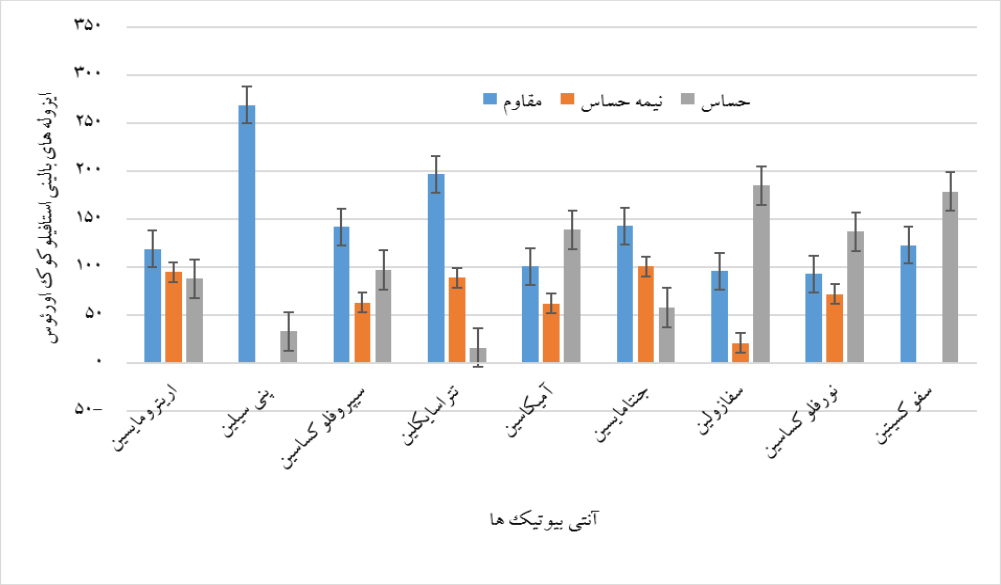
برای تکثیر ژن‌های موردمطالعه ترموسایکلر Eppendorf 5331 (ساخت آلمان) مورداستفاده قرار گرفت. سیکل‌های دمایی برای واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، سپس ۲۵ چرخه حرارتی شامل واسرشتگی ثانویه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر اولیه هم به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و برای تکثیر نهایی هم در مدت‌زمان ۱۰ دقیقه از دمای ۷۲ درجه سلسیوس استفاده گردید. در این بررسی از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC43300 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 هم به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

درنهایت ۸ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۲/۵ درصد در بافر 0.5 X الکتروفورز گردید. نتایج اولیه روی ژل با دستگاه ترانس لومیناتور (Syngene انگلیس) موردبررسی قرار گرفت و در آخر نتیجه نهایی توسط دستگاه Gel Documentation (Vilbert Lourmat Co, Japan) بررسی و از آن عکس تهیه شد. از مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باندهای موردنظر استفاده شد.

برای تجزیه‌وتحلیل نتایج به‌دست‌آمده از روش‌های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) و نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (IBM, USA) استفاده شد. همچنین آزمون آماری کای-دو برای مقایسه متغیرها در این مطالعه مورداستفاده قرار گرفتند. در این بررسی، مقدار $p \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

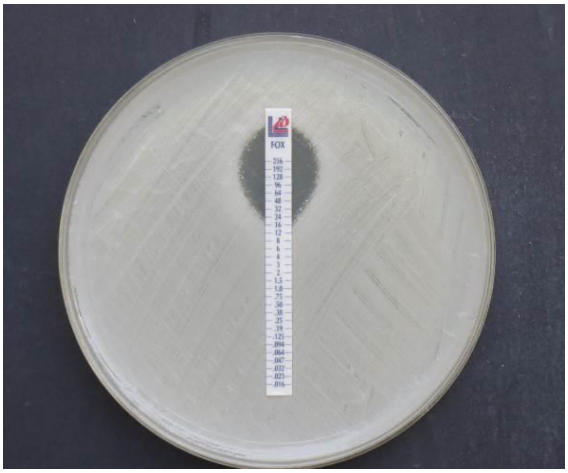
یافته‌ها

از ۳۰۲ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس ۴۲ جدایه (۱۳/۹٪) از زخم، ۵۲ جدایه (۱۶/۸۸٪) از خون، ۱۲۱ جدایه (۴۰/۰۶٪) از ادرار، ۲۹ جدایه (۹/۶٪) از تراشه، ۳۶ جدایه (۱۱/۹۲٪) از کاتتر، ۱۰ جدایه (۶/۶٪) از سواپ و ۱۲ جدایه (۳/۹٪) از بیماران سرپایی جداسازی شدند. از این میان، جدایه های موردبررسی به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و تتراسایکلین بیشترین مقاومت را داشتند (نمودار ۱).



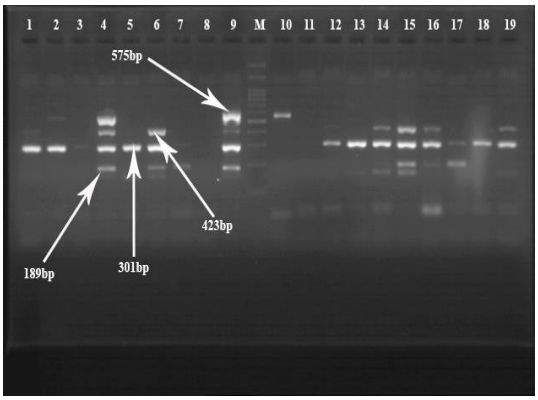
نمودار ۱ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس

۱۲۳ جدایه دارای مقاومت کامل به دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرمی و حداقل غلظت مهاری کمتر از ۴ میکروگرم/میلی‌لیتر بودند که مقاوم به متی سیلین در نظر گرفته شدند (شکل ۱).



شکل ۱: غربالگری اولیه نمونه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین به روش تعیین حداقل غلظت مهاری توسط نوار E-test Cefoxitin. ناحیه مهاری بیشتر از µg/mL ۴ حساس در نظر گرفته‌شده است. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC43300 به‌عنوان کنترل مثبت و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 هم به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین درصد فراوانی ژن‌های عامل چسبندگی برای ژن *bbp* در ۸/۱۳٪ (۱۰ جدایه)، *cna* در ۴/۸۷٪ (۶ جدایه)، *eno* در ۲۲/۷۶٪ (۲۲ جدایه) و *ebpS* در ۱۵/۴۴٪ (۱۹ جدایه) بود. علاوه بر این، از ۱۷۹ سویه استافیلوکوکوس حساس به متی سیلین، فراوانی این ژن‌ها به ترتیب برای ژن *bbp* ۲/۷۹٪ (۵ جدایه)، *cna* ۶/۷٪ (۲۲ جدایه)، *eno* ۴/۴۹٪ (۸ جدایه) و *ebpS* ۵/۵۸٪ (۱۰ جدایه) بود (شکل ۲). جدایه های به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی زخم و کاتاتر دارای بیشترین فراوانی ازنظر حضور ژن‌های عامل چسبندگی بودند (جدول ۲).



شکل ۲: الکتروفورز تکثیر موفقیت‌آمیز محصولات ژن‌های *bbp*، *cna*، *eno* و *ebpS* با طول آمپلیکون ۵۷۵ جفت باز برای ژن *bbp*، ۴۲۳ جفت باز برای ژن *cna*، ۳۰۱ جفت باز برای ژن *eno* و ۱۸۹ جفت باز برای ژن *ebpS*، بر روی ژل اگارز ۲/۵ درصد. چاهک ۱ و ۲ و ۳ و ۵ و ۶ و ۷ و ۱۰ تا ۱۹ نمونه‌های مثبت ازنظر حضور ژن‌ها. چاهک ۴ کنترل مثبت ژن‌های *bbp*، *cna*، *eno* و*ebpS*. چاهک ۸ کنترل منفی. چاهک M مارکر با طول ۱۰۰ جفت باز. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC43300 به‌عنوان کنترل مثبت و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 هم به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۲: فراوانی ژن‌های عوامل چسبندگی در جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداشده از نمونه‌های بالینی مختلف

ژن موردمطالعه	تعداد جدایه های حاوی ژن در نمونه‌های بالینی مختلف							تعداد کل جدایه های حاوی ژن‌ها
	خون	ادرار	زخم	بینی	تراشه	کاتاتر	سرپایی	
bbp	ـــــ	۱	۴	ـــــ	ـــــ	۵	ـــــ	۱۰
cna	۲	ـــــ	۲	۱	ـــــ	۱	ـــــ	۶
eno	ـــــ	۱۹	۲	۱	ـــــ	۶	ـــــ	۲۸
ebpS	۱	۱۱	۴	ـــــ	ـــــ	۳	ـــــ	۱۹
mecA	۲۹	۴۰	۱۸	۴	۱۲	۱۶	۴	۱۲۳

با توجه به فراوانی سویه‌های به‌دست‌آمده و نتایج حاصل از تحلیل‌های آماری، ارتباط معنی‌داری بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های عامل چسبندگی مشاهده شد. برای همه متغیرهای موردبررسی $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد (جدول ۳).

جدول ۳: آنالیز آماری بررسی احتمال ارتباط بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فاکتورهای چسبندگی در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

آنتی‌بیوتیک‌های موردبررسی	غلظت آنتی‌بیوتیک	جدایه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (n=۱۲۳)				
		bbp (n=۱۰)	*Can* (n=۶)	*Eno* (n=۲۸)	*ebpS* (n=۱۹)	*mecA* (n=۱۲۳)
سفوکسیتین	۳۰ (میکروگرم)	p≤۰/۰۱۸	p≤۰/۰۰۱	p≤۰/۰۴۹	p≤۰/۰۰۶	p≤۰/۰۱۹
اوگزاسیلین	۵(میکروگرم)	p≤۰/۰۱۴	p≤۰/۰۰۴	p≤۰/۰۱۴	p≤.۰/۰۲۲	p≤۰/۰۳۴
اریترومایسین	۱۵ (میکروگرم)	p≤۰/۰۱۹	p≤۰/۰۰۵	p≤۰/۰۴۹	p≤۰/۰۲۸	p≤۰/۰۲۹
پنی‌سیلین	۱۰ (واحد)	p≤۰/۰۳۴	p≤۰/۰۱۸	p≤۰/۰۲۲	p≤۰/۰۰۵	p≤۰/۰۴۵
سیپروفلوکساسین	۵ (میکروگرم)	p≤۰/۰۰۲۳	p≤۰/۰۰۱	p≤۰/۰۱۱	p≤۰/۰۰۴	p≤۰/۰۰۱
تتراسایکلین	۳۰ (میکروگرم)	p≤۰/۰۱۵	p≤۰/۰۲۸	p≤۰/۰۰۵	p≤۰/۰۲۵	p≤۰/۰۳۳
آمیکاسین	۳۰ (میکروگرم)	p≤۰/۰۲۲	p≤۰/۰۱۶	p≤۰/۰۰۱	p≤۰/۰۰۸	p≤۰/۰۴۸
سفازولین	۳۰ (میکروگرم)	p≤۰/۰۰۱	p≤۰/۰۰۲۳	p≤۰/۰۱۱	p≤۰/۰۰۴	p≤۰/۰۰۱
جنتامایسین	۱۰ (میکروگرم)	p≤۰/۰۰۳	p≤۰/۰۴۴	p≤۰/۰۴۲	p≤۰/۰۰۴	p≤۰/۰۴۹
نورفلوکساسین	۱۰ (میکروگرم)	p≤۰/۰۱۵	p≤۰/۰۲۸	p≤۰/۰۰۵	p≤۰/۰۲۵	p≤۰/۰۳۳

بحث

در عصر حاضر، عفونت ناشی از *استافیلوکوکوس* های کواگولاز منفی و کواگولاز مثبت به یکی از جدی‌ترین تهدیدهای پزشکی تبدیل‌شده است. این در حالی است که مطالعات مختلف از سال‌ها پیش تاکنون افزایش گسترده‌ای را در میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک در اعضاء این جنس نشان می‌دهد (۱۹). در آخرین مطالعاتی که Arabestani و همکاران در سال ۲۰۱۶ در همدان داشتند، مشخص شد که فراوانی سویه‌های مقاوم به متی سیلین در میان جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش از ۵۰درصد می‌باشد، که این گزارش‌ها با نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه کاملاً همخوانی دارد (۲۰). البته این فراوانی ممکن در برخی مناطق متفاوت باشد، به‌طوری‌که در مطالعاتی که در اصفهان انجام‌شده بود، مشخص شد که MRSA در بیمارستان‌های آموزشی این شهر شیوعی ۳۰ درصدی دارد و یا درگزارشاتی که از مطالعات شیوع سنجی در برخی بیمارستان‌های آموزشی از شهر تهران به‌دست‌آمده، شیوع ۱۰۰ درصدی نیز گزارش‌شده بود (۲۱). این تفاوت در شیوع در مناطق مختلف را می‌توان به عوامل مختلفی نسبت داد که از این میان می‌توان به آب‌وهوای جغرافیایی متفاوت، مهاجرت‌های جمعیتی گسترده، نمونه‌گیری در برخی فصول خاص سال و همچنین وجود سویه‌های جهش‌یافته‌تر در برخی شهرها با پوشش جمعیتی متراکم‌تر اشاره کرد. این در حالی است که *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، به دلیل خاصیت فیزیولوژیکی خاص خود در برابر بسیاری از شوینده‌ها و مهارکننده‌های کاتیونی-آنیونی مقاومت نسبی دارد و می‌تواند به‌راحتی در مکان‌های پرتردد مانند بیمارستان‌ها، مستقرشده و در طی چندین نسل، جهش‌های خاصی را در خود ایجاد نماید. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های موردبررسی در این مطالعه نشان‌دهنده یک الگوی کاملاً پیچیده و مفهومی می‌باشد. به‌طوری‌که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، جنتامایسین، کلیندامایسین و سفازولین با الگویی متفاوت ازنظر نوع نمونه بالینی مشاهده شد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به پنی‌سیلین و اریترومایسین با فراوانی بیش از ۹۰ درصد بود. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش‌شده در مطالعات داخلی و خارجی دارای مشابهت بامطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعاتی که Dibah و همکاران در سال۲۰۱۴ در زنجان بر روی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انجام دادند، مشخص شد که بیش از ۹۰ درصد از جدایه های بالینی موردمطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اریترومایسین و جنتامایسین مقاومت دارند (۲۲). علاوه بر این در مطالعاتی که Arabestani و همکاران در سال ۲۰۱۵ در شهر همدان انجام دادند، نشان دادند که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، نسبت به سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، تتراسایکلین و جنتامایسین می‌باشد که ازنظر میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بامطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۳).

البته در برخی مطالعات صورت گرفته در شهرهای مختلف ایران و همچنین سایر کشورهای دیگر، میزان شیوع متفاوتی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی را می‌توان دید. این امر را می‌توان به فرهنگ مصرف دارو، الگوی صحیح ارائه نسخه توسط پزشکان، عدم گسترش سویه‌های جهش‌زا و همچنین آب‌وهوای منطقه نسبت داد. در مطالعاتی که Hajdu و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشور استرالیا بر روی ارتباط درجه حرارت و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام دادند، مشخص شد که بین این دو متغیر ارتباط وجود دارد. در این بررسی با افزایش میزان دما، مقاومت نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های خاص افزایش یابد. البته این امر را نباید نادیده گرفت که دما و اثرات آن بر روی آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر بیوفیلم به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای خود را نشان می‌دهد. از مهم‌ترین دلایل این امر، افزایش ضخامت بیوفیلم باکتری در دماهای بالا می‌باشد، به‌طوری‌که باکتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند داپتومایسین و ونکومایسین مقاوم می‌کند (۲۴).

این ژن‌ها که عوامل چسبندگی و توکسینی را به‌طور گسترده کد می‌کنند، سویه‌های خطرناکی را ایجاد می‌کنند که در برخی اعضای بدن مانند خون و بافت‌ها عفونت ایجاد کرده و می‌توانند در برخی موارد حتی باعث مرگ بیمار نیز شوند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فراوانی ژن‌های عوامل ادهسینی خارجی *bbp*، *can*، *eno* و *ebpS* در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به ترتیب ۱۰ (۶/۸۹ درصد)، ۶ (۴/۱۳ درصد)، ۲۸ (۱۹/۳۱ درصد) و ۱۹ (۱۳/۱ درصد) بودند. در مطالعاتی که Alli OA و همکاران در سال ۲۰۱۶ در نیجریه انجام دادند، مشخص شد که نتیجه فراوانی ژن *bbp* با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد(۱۱). در مطالعات Goudarzi و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تهران که بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین انجام شد، نیز فراوانی ژن‌های عامل چسبندگی و ادهزینی خارجی با نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه همخوانی داشت (۲۵).

وجود یا عدم وجود ارتباط بین عوامل بیماری‌زایی باکتری‌ها و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، پیوسته در مطالعات مختلف موردبررسی قرارگرفته است (۲۶). در مطالعاتی که Astha و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور هند بر روی ارتباط عوامل بیماری‌زایی و الگوی مقاومتی در *استافیلوکوکوس* ها داشتند، مشخص شد که در برخی سویه‌ها می‌توان شاهد این ارتباط بود. این امر در حالی است که، در مطالعه حاضر، در سویه‌های حساس ازنظر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، پراکنش برخی ژن‌های چسبندگی به میزان کمتری دیده شد. علاوه بر این، مقاومت به متی سیلین زمینه مناسبی را جهت فعالیت این ژن‌ها فراهم کرد. به‌طوری‌که در سویه‌های مقاوم به متی سیلین پراکنش این ژن‌ها به‌مراتب بیشتر از سویه‌های حساس مشاهده شد (۲۷). در بررسی‌های انجام‌شده توسط Meredith و همکاران در سال ۲۰۱۷ در کشور آمریکا، مشخص شد که می‌تواند بین عوامل بیماری‌زا، خصوصاً عوامل چسبندگی در باکتری‌های مختلف ازجمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط مستقیمی برقرار کرد. در این مطالعه مروری، شدت بخشی عوامل محیطی ازجمله حضور برخی یون‌ها، مشخصات میزبان آلوده شونده توسط باکتری، خصوصیات متفاوت سویه‌های متفاوت یک‌گونه و واکنش‌های متفاوت سویه‌های تحت درمان به دوزهای مختلف آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان فاکتورهای مهم در وجود یا عدم وجود این ارتباط مطرح شد (۲۸). پس، با توجه به مواردی که در مطالعات مختلف ذکر شد و نتایجی که در این مطالعه به دست آمد، می‌توان وجود این ارتباط بین عوامل بیماری‌زا و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را محتمل دانست، به‌نحوی‌که، در سویه‌های دارای الگوی مقاومت چند دارویی این امر با وضوح بیشتری قابل‌مشاهده می‌باشد.

تهاجم گسترده برخی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ازنظر تولید فاکتورهای بیماری‌زا، ازجمله عوامل چسبندگی، می‌تواند نتیجه استفاده نابجا و کنترل نشده آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف باشد. این امر تا جایی افزایش‌یافته است که شاهد ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه و باقدرت تهاجم بالا می‌باشیم. ازاین‌رو، با در نظر گرفتن نقش مؤثر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این زمینه، نقش نظارت جدی‌تر بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، بسیار ضروری می‌باشد. علاوه بر این، با شناسایی به‌موقع و دقیق سویه‌های بیماری‌زا، و درمان قطعی عفونت‌های ناشی از آن‌ها، می‌توان از گسترش و انتشار بین‌گونه‌ای این ژن‌های عوامل بیماری‌زایی نیز جلوگیری کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح هیئت‌علمی است که در سال ۱۳۹۵ با شماره ۹۵۱۰۱۴۵۹۶۲ و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارد.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Zarei Koosha R, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mehdizadeh Aghdam E, Ghorbani Tajandareh S, Imani Fooladi AA. Distribution of tsst-1 and mecA Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated From Clinical Specimens. Jundishapur J Microbiol**.** 2016; 9(3):1-8.
2. Agnoletti F, Mazzolini E, Bacchin C, Bano L, Berto G, Rigoli R, et al. First reporting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people. Vet Microbiol 2014; 170(1–2):172-7.
3. Taylor AR. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Primary Care: Clinics in Office Practice 2013; 40(3):637-54.
4. Khazaei S, Pourtahmaseby P, Kanani M, Madani SH, Malekianzadeh E. *Staphylococcus aureus* Resistance to Vancomycin: A Six Years Survey, (2006-2012). Med J Tabriz Univ Med Sci**.**2013; 5 **(**35**)**:40-45.
5. Sahebnasagh R, Saderi H, Owlia P. The Prevalence of Resistance to Methicillin in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients by PCR Method for Detec-tion of *mecA* and nuc Genes. Iran J Public Health 2014; 43(1):84-92.
6. Loncaric I, Kubber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, et al. *mecC*- and *mecA*-positive meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from livestock sharing habitat with wildlife previously tested positive for mecC-positive MRSA. Vet Dermatol 2014; 25(2):147-8.
7. Marshall H, Nissen M, Richmond P, Shakib S, Jiang Q, Cooper D, et al. Safety and immunogenicity of a booster dose of a 3-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine (SA3Ag) in healthy adults: A randomized phase 1 study. J Infect 2016; 73(5):437-54.
8. Mackey-Lawrence NM, Jefferson KK. Regulation of *Staphylococcus aureus* immunodominant antigen B (IsaB). Microb Res 2013; 168(2):113-8.
9. Khorvash F, Abbasi S, Khomarbaghi N, Shokri D, Akhond MR, Rostami S. Investigating the Frequency of *Staphylococcus aureus* Colonization in Intensive Care Unit Patients in Admission and during Hospitalization, Alzahra Hospital, Isfahan, Iran. J Isfahan Med Sch 2013; 31(230): 364-71.
10. Khoramian B, Jabalameli F, Niasari-Naslaji A, Taherikalani M, Emaneini M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. Microb Pathog 2015; 88(11):73-7.
11. Alli OA, Ogbolu DO, Shittu AO, Okorie AN, Akinola JO, Daniel JB. Association of virulence genes with mecA gene in *Staphylococcus aureus* isolates from Tertiary Hospitals in Nigeria. Indian J Pathol Microbiol 2015; 58(4):464-71.
12. Imani Fooladi AA, Ashrafi E, Tazandareh SG, Koosha RZ, Rad HS, Amin M, et al. The distribution of pathogenic and toxigenic genes among MRSA and MSSA clinical isolates. Microb pathog 2015; 81(4):60-6.
13. Srinivasan A, Bankowski MJ, Seifried SE, Jinno S, Perkins R, Singh S, et al. A probe-based method for confirmation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and detection of Panton–Valentine leukocidin and tst virulence genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(4):541-3.
14. Hu DL, Omoe K, Inoue F, Kasai T, Yasujima M, Shinagawa K, et al. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. JMed Microb 2008; 57(9):1106-12.
15. Tahmasebi h, Bokaeian m, Adabi j. Coagulase-Negative, Beta-lactam, antibiotic resistance, methicillin resistance. J Jahrom Univ Med Sci 2016; 14(1):55-63.

16. Bokaeian M, Adabi J, Zeyni B, Tahmasebi H. The Presence of aac (6 ') Ie / aph (2 "), aph (3') -IIIa1, ant (4 ')-Ia1 Genes and Determining Methicillin Resistance in *Staphylococcus Epidermidis* and Staphylococcus Saprophyticus Strains Isolated from Clinical Specimens. J Arak Univ Med Sci 2017; 19(11):11-25.

17. CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015.

18. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of Multiplex PCR To Identify *Staphylococcus aureus* Adhesins Involved in Human Hematogenous Infections. J CliniMicrobiol 2003; 41(9):4465-7.

19. Oryan G, Faghri J, Fazeli H, Hosseini NS, Sedighi M. Prevalence and Antibacterial Resistance of Coagulase Negative *Staphylococci* in Keratitis Infections Following the Use of Soft Contact Lenses. J Isfahan Med Sci 2014; 32(277): 273-81

20. Arabestani MR, Abdoli Kahrizi M. 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. J Arak Univ Med Sci 2016;18(11):44-53.

21. Havaei SA, Vidovic S, Tahmineh N, Mohammad K, Mohsen K, Starnino S, et al. Epidemic Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Lineages Are the Main Cause of Infections at an Iranian University Hospital. J Clinl Microbiol 2011;49(11):3990-3.

22. Dibah S, Arzanlou M, Jannati E, Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. Iran J Microbiol 2014;6(3):163-168.

23. Arabestani MR, Rastiany S, Mousavi SF, Ghafel S, Alikhani MY. Identification of toxic shock syndrom and exfoliative toxin genes of *Staphylococcus aureus* in carrier persons, resistant and susceptible methicillin. Tehran Univ Med J 2015;73(8):554-60.

24. Hajdu S, Holinka J, Reichmann S, Hirschl AM, Graninger W, Presterl E. Increased Temperature Enhances the Antimicrobial Effects of Daptomycin, Vancomycin, Tigecycline, Fosfomycin, and Cefamandole on Staphylococcal Biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(10):4078-84.

25. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Nasiri MJ, Goudarzi H, Sajadi Nia R, Dabiri H. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from patients with bacteremia based on MLST, SCCmec, spa, and agr locus types analysis. Microb Pathog 2017; 104(3):328-35.

26. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol 2016;7 (4):483-493.

27. Agarwal A, Jain A. Association between drug resistance & production of biofilm in *staphylococci*. Indian J Med Res 2012; 135(4):562-564.

28. Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. Genes 2017; 8(1):39.