

## تایپینگ مولکولی سویه‌های Staphylococcus Aureus مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های شهر تهران در سال ۱۳۹۵ بر اساس الگوی agr

سارا نصیریان<sup>۱</sup>، سارا سعادت‌مند<sup>۲</sup>، مهدی گودرزی<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** Staphylococcus aureus، از جمله شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. افزایش عفونت‌های ناشی از این باکتری و مقاومت آن به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث بروز مشکلات بسیاری شده است. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی مولکولی Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus یا MRSA) جدا شده از بیماران بستری در Intensive care unit (ICU) بیمارستان‌های شهر تهران بود.

**روش‌ها:** در این پژوهش، ۴۴۳ نمونه بالینی جهت جداسازی MRSA مورد بررسی قرار گرفت و ۱۲۵ نمونه وارد مطالعه شد. پس از جداسازی MRSA، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جداسازی شده به روش انتشار دیسک در آگار (Disk diffusion) بررسی گردید. در ادامه، تمامی سویه‌های MRSA از نظر وجود ژن‌های کد کننده توکسین Pantone-Valentine leukocidin (PVL) و Toxic shock syndrome toxin (TSST) با استفاده از تکنیک Polymerase chain reaction (PCR) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، تایپینگ agr با استفاده از تکنیک Multiplex PCR تعیین شد.

**یافته‌ها:** بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۲۲ مورد، ۹۷/۶ درصد)، کانامایسین (۱۰۵ مورد، ۸۴/۰ درصد) و جنتامایسین (۹۵ مورد، ۷۶/۰ درصد) بود. در میان ۱۲۵ گونه‌ی MRSA، شایع‌ترین ژن به tst (۸۴ مورد، ۶۷/۰ درصد) و سپس ژن pvl (۲۵ مورد، ۲۰/۰ درصد) اختصاص یافت. شایع‌ترین نوع agr نیز به تایپ I با فراوانی ۵۲/۰ درصد، تایپ III با فراوانی ۳۴/۴ درصد، تایپ II با فراوانی ۹/۶ درصد و تایپ IV با فراوانی ۴/۰ درصد تعلق داشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاکی از افزایش قابل توجه مقاومت Staphylococcus aureus نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بود که هشدار جدی جهت درمان عفونت‌های ناشی از Staphylococcus aureus می‌باشد. بنابراین، سیاست مصرف این آنتی‌بیوتیک‌ها باید مورد بازبینی قرار گیرد. همچنین، الگوی تولید توکسین و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های با agr تایپ مختلف، متفاوت بود و پیشنهاد می‌شود که خصوصیات مولکولی سویه‌ها به صورت دوره‌ای مورد بررسی قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** Staphylococcus aureus، مقاومت به متی‌سیلین، تایپینگ مولکولی

**ارجاع:** نصیریان سارا، سعادت‌مند سارا، گودرزی مهدی. تایپینگ مولکولی سویه‌های Staphylococcus Aureus مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های شهر تهران در سال ۱۳۹۵ بر اساس الگوی agr. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۵۱):

۱۴۳۱-۱۴۳۴

طوری که می‌تواند از یک عفونت زخم، جوش و آبسه تا سپتی‌سمی، پنومونی، سندرم شوک سمی، مسمومیت غذایی، باکتری، اندوکاردیت و عفونت مجرای ادراری (Urinary tract infections یا UTI) متفاوت باشد (۱). Staphylococcus aureus مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها و فلوروکوئینولون‌ها از خود نشان

### مقدمه

Staphylococcus aureus یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های کسب شده از بیمارستان (Hospital-acquired) می‌باشد. عفونت‌های استافیلوکوکی اغلب به صورت حاد، تب‌زا و در صورت عدم درمان، قابل انتشار به بافت‌های مجاور و سایر بافت‌ها از طریق باکتری هستند. به طور کلی، بیماری‌های ناشی از این باکتری طیف بسیار وسیعی دارد؛ به

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

خون، منجر به نارسایی عملکرد بسیاری از ارگان‌ها و در نهایت، مرگ می‌شود. از دیگر توکسین‌های مهم تولید شده توسط این باکتری می‌توان به Panton-Valentine leukocidin (PVL) اشاره کرد. این لکوسیدین شامل دو جزء پروتئینی S و F است که تحت کنترل ژن‌های LukF/PV و LukS/PV می‌باشد. این توکسین نقش بسیار مهمی در تخریب غشای سلول‌های انسانی مانند نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و مونوسیت‌ها دارد و در غلظت‌های بالا منجر به القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های انسانی می‌گردد.

حداقل سه خانواده از اجزای سیستم‌های تنظیمی عمومی در بیان ژن‌های ویروالانس باکتری وجود دارد که از جمله مهم‌ترین آن‌ها، سیستم‌های تنظیمی دو جزئی هستند و مهم‌ترین سیستم از بین این سیستم‌ها، Accessory gene regulator (agr) نام دارد که نوعی تنظیم‌کننده‌ی گلوبال است و در تنظیم تعداد بی‌شماری از عوامل کلونیزاسیون، بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش دارد. استافیلوکوک چهار پلی‌پپتید اصلی دارد که متغیر بودن توالی‌های آن باعث به وجود آمدن حداقل چهار گروه (I، II، III و IV) شده است. این لوکوس می‌تواند در جهت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها با به کارگیری سیستم کوئوروم سنسینگ (Quorum sensing یا QS)، بیشترین مقاومت دارویی را ایجاد کند. به طور خلاصه، محصول Autoactivating peptide در ترشح agr B و agr D در پردازش و ترشح AIP نقش دارند. در مرحله بعد، AIP سبب فسفریلاسیون agr C می‌شود و این مولکول نیز agr A را فعال می‌نماید و agr A نیز سبب فعال شدن پروموت‌های P2 و P3 می‌گردد (۵). در این باکتری، مقاومت رو به گسترشی در برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مشاهده می‌شود و احتمال ارتباط ناحیه‌ی agr با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطرح گردیده است. با توجه به ضرورت کسب اطلاعات بیشتر در مورد این باکتری، در پژوهش حاضر با استفاده از روش agr تایپینگ، تیپ‌های مختلف MRSA جدا شده از بیماران بستری در بخش ICU بیمارستان‌های شهر تهران شناسایی و خصوصیات تایپ‌ها از نظر مقاومت و پروفایل توکسینی، به منظور بررسی چرخش سویه‌ای خاص در بیمارستان‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

### روش‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی، در طول یک دوره‌ی یک ساله (از اسفند سال ۱۳۹۴ تا دی ماه ۱۳۹۵)، ۱۲۵ سویه‌ی MRSA جدا شده از بیماران بستری در بخش ICU مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های مورد مطالعه از نمونه‌های مختلف مانند خون (۵۳ نمونه، ۴۲/۴ درصد)، کاتتر (۳۲ نمونه، ۲۵/۶ درصد)، گوش (۱۲ نمونه، ۹/۶ درصد)، عفونت‌های زخم (۱۰ نمونه، ۸/۰ درصد)، چرک

می‌دهد. بنابراین، امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومایسین به عنوان داروهای مؤثر در دسترس هستند. اگرچه امروزه مقاومت به ونکومایسین در برخی از سویه‌های *Staphylococcus aureus* نیز شناسایی شده است (۲).

یکی از مهم‌ترین مقاومت‌ها در بین ایزوله‌های بالینی *Staphylococcus aureus*، مقاومت به متی‌سیلین است؛ به طوری که *Staphylococcus aureus* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* یا MRSA)، یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی جامعه به شمار می‌رود. مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌ها به دلیل پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin binding proteins یا PBPs) تغییر شکل یافته ایجاد می‌شود. مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در ایزوله‌های بالینی *Staphylococcus aureus* برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ و تنها چند سال پس از شروع تجویز متی‌سیلین در انگلستان مشاهده شد و اکنون سویه‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک، به عنوان یک عامل عفونت بیمارستانی در بخش‌هایی از بیمارستان به خصوص بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive care unit یا ICU) مطرح می‌باشد. از آن زمان، فراوانی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین به طور مداوم افزایش یافت؛ به طوری که عفونت‌های بیمارستانی گسترده‌ای از این باکتری در نقاط مختلف دنیا در دهه‌ی ۱۹۷۰ گزارش شد (۳).

ایزوله‌های MRSA معضلی جدی در دنیا محسوب می‌شود. مطابق با آمارهای جهانی، میزان مرگ و میر ناشی از سویه‌های MRSA حدود ۰/۴ تا ۲۰ درصد برآورد شده است. اگرچه میزان بروز این سویه‌ها در مناطق مختلف و بیمارستان‌های مختلف یکسان نیست، اما در مجموع این میزان در تمام دنیا رو به افزایش است. امروزه با وجود تلاش‌های فراوان در کنترل عفونت‌ها، پراکندگی این سویه‌ها پیوسته در حال افزایش است و تغییرات جغرافیایی، تأثیر زیادی بر این امر دارد. بنابراین، MRSA در کنار ایزوله‌های حساس، قادر است مشکلات عدیده‌ای را برای عفونت‌های بیمارستانی پدید آورد (۴).

*Staphylococcus aureus* قادر به تولید طیف وسیعی از توکسین‌ها (که نقش بسیار مهمی در ایجاد بیماری در میزبان دارند) می‌باشد. سوپراآنتی‌ژن‌های پیروژنیک (Pyrogenic toxin superantigens یا PTSAgs)، گروهی از آگزوتوکسین‌ها هستند که توسط *Staphylococcus aureus* تولید می‌شوند و شامل انواع مختلف انتروتوکسین و سم ۱-Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) می‌باشند. این توکسین‌ها توانایی بالایی برای بیماری‌زایی در انسان و حیوانات دارند. سندرم شوک توکسیک ناشی از توکسین ۱-TSST، نوعی اختلال حاد و کشنده است که به علت کاهش غیر طبیعی حجم

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک، از سویه‌ی *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 استفاده گردید.

سپس تمامی سویه‌های MRSA از نظر وجود ژن‌های کد کننده‌ی توکسین‌های PVL (ژن pvl) و TSST (ژن tst) با توجه به توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعات ایجاد شده در جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفت. سیکل حرارتی به منظور تکثیر ژن‌های توکسین شامل یک مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی دناتوراسیون در دمای ۹۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال در دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه با ۳۰ سیکل تکرار و در پایان، مرحله‌ی گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود. در نهایت، جهت تعیین تایپ‌های مختلف agr از تکنیک Multiplex PCR و پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد. همچنین، برنامه‌ی دمایی به منظور تکثیر ژن‌های agr شامل دمای دناتوراسیون اولیه‌ی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، پس از آن ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، محصولات به دست آمده با استفاده از روش الکتروفورز و در ژل آگاروز ۱/۵ درصد بررسی گردید. همچنین، از سویه‌های agr type 1 (RN 6390)، agr type 2 (RN 6607)، agr type 3 (RN 8465) و agr type 4 (RN 4850) به عنوان سویه‌های رفرنس در تکنیک تایپینگ agr استفاده شد.

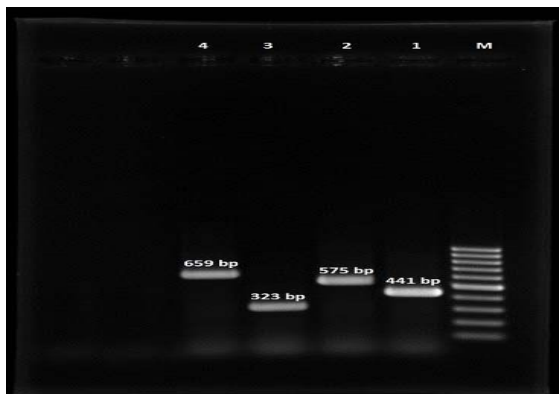
۹) نمونه، ۷/۲ درصد، مایعات بدن (۷ نمونه، ۵/۶ درصد) و ادرار (۲ نمونه، ۱/۶ درصد) جداسازی گردید. نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن و در کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال یافت. از روش‌های استاندارد میکروبی‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی گرم، بررسی تولید کاتالاز و کوآگولاز و تست DNase و رشد در محیط Mannitol salt agar (MSA) به منظور شناسایی فنوتیپی باکتری مورد استفاده قرار گرفت. به منظور شناسایی سویه‌های MRSA، ابتدا تمامی سویه‌ها به روش فنوتیپی و سپس به روش ژنوتیپی با استفاده از تکنیک Polymerase chain reaction (PCR) جهت بررسی وجود ژن mec-A و با استفاده از کیت استخراج کپازن و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تأیید گردید. تمامی سویه‌ها از نظر وجود ژن‌های fem (مؤثر در سنتز دیواره‌ی سلولی یا در میزان اتولیز باکتری MRSA) و nuc (ژن آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز - کد کننده‌ی نوکلئاز مقاوم به حرارت) جهت تأیید قطعی سویه‌ها با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تأیید قطعی سویه‌های MRSA، مقاومت این سویه‌ها نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک شامل آمپی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، کانامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۵ میکروگرم)، لینزولید (۲ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، تیکوپلانتین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، تورامایسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۱۰ میکروگرم) و سفتریاکسون (۲۵ میکروگرم) به روش انتشار دیسک در آگار (Disk diffusion) مورد بررسی قرار گرفت و به عنوان کنترل مثبت به منظور صحت انجام کار و همچنین، بررسی کنترل کیفی

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

منبع	محصول اندازه (جفت باز)	توالی پرایمر	پرایمر	Target
۶	۶۴۸	CTTACTTACTGCTGTACCTG ATCTCGCTTGTGTGTGC	F R	fem A
۷	۲۷۰	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAATAAAGC	F R	nuc A
۷	۵۸۳	AGAAGATGGTATGTGGAAGTTAG ATGTATGTGCGATTGTATTGC	F R	mecA
۸	۱۸۰	TTCACTATTTGTA AAAAGTGTCAGACCCACT TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT	F R	Luk-PV
۹	۳۹۸	TTATCGTAAGCCCTTTGTTG TAAAGGTAGTTCTATTGGAGTAGG	F R	TSST-1
۱۰	-	ATGCACATGGTGCACATGC GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC GTAATGTAATAGCTGTATAATAATACCCAG CGATAATGCCGTAATACCCG	Pan F R1 R2 R3 R4	agr

TSST-1: Toxic shock syndrome toxin-1; Luk-PV: Panton-Valentine leukocidin



شکل ۲. تایپینگ لوکوس agr

باند M: نشانگر ۱۰۰ جفت باز DNA، باند ۱: نوع agr نوع I، باند ۲: نوع agr نوع II، باند ۳: نوع agr نوع III و باند ۴: نوع agr نوع IV

### بحث

*Staphylococcus aureus* به عنوان یک عامل بیماری‌زای قدرتمند که عفونت‌های متعددی را ایجاد می‌کند، شناخته می‌شود. همچنین، این باکتری در طی چند دهه‌ی گذشته به شایع‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی تبدیل شده است. یکی از عوامل موفقیت این باکتری، کسب فاکتورهای مقاومت می‌باشد؛ بدین صورت که با ورود هر آنتی‌بیوتیک جدید، سویه‌های مقاوم باکتری به سرعت ظهور یافته و درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری را با دشواری مواجه کرده‌اند. به عنوان مثال، با ورود پنی‌سیلین به بازار و استفاده از این دارو در درمان بیماران بستری، به سرعت سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین ایجاد شدند (۱۱). امروزه در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *Staphylococcus aureus* از متی‌سیلین استفاده می‌شود که متأسفانه با ظهور سریع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، این نوع آنتی‌بیوتیک نیز کارایی خود را از دست داده است. بنابراین، برای مقابله با سویه‌های این باکتری، مطالعات اپیدمیولوژیک و درک نحوه‌ی انتشار و گسترش این باکتری مهم به نظر می‌رسد (۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر، کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تیکوپلانین، موپیروسین و کوئینوپریستین - دالفوپریستین بود که با نتایج تحقیقات Khan و همکاران (۱۳) و Vindel و همکاران (۱۴) همسو بود. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به پنی‌سیلین، کانامایسین، جنتامایسین و اریترومایسین اختصاص یافت که با نتایج پژوهش جوان و همکاران (۱۵) همخوانی داشت، اما در رابطه با اریترومایسین، با مطالعه‌ی Melake و همکاران (۱۶) مشابه نبود. کاهش حساسیت این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سیپروفلوکساسین، تراسایکلین، جنتامایسین، اریترومایسین، سفالوتین و سفتازیدیم شاید به این دلیل باشد که در ایران از این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از این سویه و سایر عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های دیگر، زیاد استفاده می‌شود.

### یافته‌ها

بیشترین شیوع عفونت MRSA در مطالعه‌ی حاضر بین بیماران با گروه سنی ۲۱ تا ۴۵ سال (۷۱/۲ درصد) و کمترین میزان آن در گروه سنی کمتر از ۲۰ سال (۸/۰ درصد) مشاهده گردید. همچنین، از ۴۴۳ نمونه‌ی مختلف بالینی مورد بررسی، ۱۲۵ نمونه MRSA جدا شد. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۲۲ مورد، ۹۷/۶ درصد)، کانامایسین (۱۰۵ مورد، ۸۴/۰ درصد)، جنتامایسین (۹۵ مورد، ۷۶/۰ درصد)، اریترومایسین (۸۸ مورد، ۷۰/۴ درصد)، تراسایکلین (۷۸ مورد، ۶۲/۴ درصد)، کلیندامایسین (۷۰ مورد، ۵۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۶۳ مورد، ۵۰/۴ درصد)، آمیکاسین (۶۰ مورد، ۴۸/۰ درصد)، توبرامایسین (۵۸ مورد، ۴۶/۴ درصد)، سفتریاکسون (۴۹ مورد، ۳۹/۲ درصد)، موپیروسین (۳۲ مورد، ۲۵/۶ درصد)، تریمتوپریم - سولفامتوکسازول (۲۱ مورد، ۱۶/۸ درصد) و کوئینوپریستین - دالفوپریستین (۱۲ مورد، ۹/۶ درصد) گزارش شد. لازم به ذکر است که همه‌ی ایزوله‌ها به تیکوپلانین و لیزولید حساس بودند.

در میان ۱۲۵ گونه‌ی MRSA، شایع‌ترین ژن توکسین، tst (۸۴ مورد، ۶۷/۲ درصد) و پس از آن pvl (۲۵ مورد، ۲۰/۰ درصد) بود که نتایج الکتروفورز این ژن‌ها در شکل ۱ آورده شده است. ژن pvl در سویه‌های MRSA، ۷۲ درصد از عفونت زخم و ۲۸ درصد از خون تشخیص داده شد.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز ژن‌های به دست آمده

باند M: نشانگر ۱۰۰ جفت باز DNA، باند ۱: ژن pvl و باند ۲: ژن tst

بر اساس آنالیز Multiplex PCR برای تعیین تایپ‌های مختلف agr مشخص گردید که ۶۵ نمونه (۵۲ درصد) به نوع I، ۴۳ نمونه (۳۴/۴ درصد) به نوع III، ۱۲ نمونه (۹/۶ درصد) به نوع II و ۵ نمونه (۴/۰ درصد) به نوع IV اختصاص یافت که نتایج الکتروفورز آن در شکل ۲ ارائه شده است. تمام ایزوله‌های حمل‌کننده‌ی ژن pvl، نوع I اختصاص داشت. ژن کدکننده‌ی توکسین tst نیز بین انواع مختلف agr توزیع شده بود.

مختلف *agr* شامل ۶۱/۷ درصد *agr* نوع I، ۸/۴ درصد *agr* نوع II و ۳۳/۵ درصد *agr* نوع III بود و *agr* نوع IV نیز مشاهده نگردید (۳۱). در مطالعه‌ی حاضر، بیشتر ایزوله‌های آزمایش شده به *agr* نوع I (۵۲ درصد) اختصاص داشت که با نتایج تحقیقات Indrawattana و همکاران (۳۲) و گودرزی و همکاران (۳۳) همخوانی داشت.

طبق بررسی‌های اخیر، گروه‌های اختصاصی *agr* با عفونت ایجاد شده به وسیله‌ی *Staphylococcus aureus* مرتبط می‌باشد. مطالعاتی که در این زمینه انجام شده است، نشان می‌دهد که بعضی از تایپ‌های *agr* با نوع خاصی از بیماری ارتباط دارد. به طور مثال، یک تحقیق در آمریکا به این نتیجه رسیده است که ایزوله‌های *Staphylococcus aureus* مولد سندرم شوک توکسیک متعلق به *agr* نوع III و سویه‌های مولد سندرم فلسی شدن پوست نیز متعلق به *agr* نوع IV می‌باشد (۳۴). همچنین، نتایج مطالعه‌ی Ben Ayed و همکاران (۳۴) نشان داد که ایزوله‌های متعلق به *agr* نوع III، عامل عفونت‌های غیر تهاجمی و ایزوله‌های متعلق *agr* نوع I، عامل عفونت تهاجمی به خصوص باکتری می‌هستند. تفاوت نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های برخی از تحقیقات می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع و محل نمونه‌گیری باشد.

در مطالعه‌ی حاضر، ایزوله‌های دارای PVL متعلق به *agr* نوع I بودند. همچنین، بیشتر ایزوله‌ها به *agr* نوع I و بعد از آن به *agr* نوع III اختصاص داشت که این یافته با گزارش پژوهش‌های Ben Ayed و همکاران (۳۴) و قاسمیان و همکاران (۳۵) همخوانی داشت. تحقیقات مذکور مربوط به پراکندگی *agr* مبنی بر فراوانی کم نوع II و IV بود. همچنین، در مطالعه‌ی حاضر تمام ژن‌های توکسین بیشتر در *agr* نوع I مشاهده شد که با نتایج پژوهش نوروزیان و همکاران (۲۹) همخوانی داشت.

این یافته‌ها کمک می‌کند تا فرض کنیم که *agr* نوع I می‌تواند نقش مهمی در تنظیم توکسین‌ها و Adhesion‌های استایلوکوکوی داشته باشد. در مجموع، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی افزایش مقاومت *Staphylococcus aureus* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بود که این مسأله هشدار جدی جهت درمان عفونت‌های ناشی از *Staphylococcus aureus* در منطقه می‌باشد. با توجه به این که امروزه در لیستی مبنی بر باکتری‌های مقاوم به دارو در WHO World Health Organization (MRSA)، در اولویت دوم (شدید) قرار گرفته است؛ به منظور جلوگیری از افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، جلوگیری از تجویز بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس و توجه ویژه به ضد عفونی کردن بیمارستان‌ها به ویژه بخش‌های حساس‌تر مانند ICU، امری ضروری می‌باشد. همچنین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که *agr*

در بررسی حاضر، سطح بالای مقاومت به پنی‌سیلین (۹۷/۱ درصد) مشاهده گردید که با نتایج مطالعات انجام شده پیشین در ایران (۷)، ترکیه (۱۷) و ایتالیا (۱۸) مطابقت داشت و می‌تواند به دلیل استفاده‌ی گسترده از بتالاکتام‌ها در بیمارستان‌ها برای درمان عفونت‌های مختلف و در واقع، استفاده‌ی بی‌رویه از این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران باشد. میزان مقاومت به جنتامایسین در تحقیق حاضر، ۴۳ درصد به دست آمد که با نتایج پژوهش گودرزی و همکاران (۱۹) همسو بود، اما بالاتر از موارد گزارش شده در مطالعه‌ی هوایی و همکاران (۲۰) و کمتر از نتایج حاصل شده در تحقیق Wang و همکاران (۲۱-۲۲) می‌باشد. همچنین، مقاومت نسبی نسبت به کانامایسین (۸۴ درصد)، آمیکاسین (۴۸ درصد) و توبرامایسین (۴۶/۴ درصد) در تحقیق حاضر، با مقادیر گزارش شده در مطالعات Ko و همکاران (۲۳) و گودرزی و همکاران (۱۹) مطابقت داشت.

بیشتر مطالعاتی که در کشور ما بر *Staphylococcus aureus* تولیدکننده‌ی توکسین‌های Toxic Shock Syndrome Toxin-1 و Staphylococcal enterotoxin B (SEB) (TSST-1) انجام شده، اغلب بر روی ایزوله‌های حیوانی و منابع غذایی بوده است. بنابراین، پژوهش حاضر که به بررسی حضور توکسین‌های مولد سندرم شوک سمی در بیماران آلوده به عفونت‌های *Staphylococcus aureus* بستری در بخش ICU بیمارستان‌های شهر تهران پرداخت، از جمله اولین تحقیقات انسانی در این زمینه به شمار می‌رود (۲۳).

نوروزی و همکاران در تحقیق خود، شناسایی ژن *tst* در *Staphylococcus aureus* را با روش PCR مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه‌ی آن‌ها از ۸۰ جدایه‌ی مورد بررسی، ۷ جدایه (۵/۲ درصد) دارای ژن *tst* و ۱۴ جدایه (۳۵/۰ درصد) دارای ژن *sec* بودند (۲۴). تیهو و همکاران نیز توزیع فراوانی ژن *tst* در ۱۰۰ جدایه‌ی *Staphylococcus aureus* را مورد بررسی قرار دادند که نتیجه‌ی آن، حضور ژن *tst* در ۲۰ جدایه از *Staphylococcus aureus*‌های مورد بررسی (۲۰ درصد) بود (۲۵). شایع‌ترین ژن توکسین در تحقیق حاضر، *tst* (۶۷/۲ درصد) بود که از مقادیر به دست آمده در مطالعات صورت گرفته در کلمبیا (۱۰/۰ درصد) (۲۶)، مالزی (۰/۵ درصد) (۲۷)، سوئد (۲۲/۰ درصد) (۲۸) و ایران (۵۱/۴ درصد) (۲۹) بالاتر بود.

نتایج تحقیق Shopsis و همکاران در آمریکا نشان داد که ۴۲ درصد سویه‌ها متعلق به *agr* نوع I، ۲۴ درصد متعلق به *agr* گروه II و ۳۴ درصد متعلق به *agr* گروه IV بود و بیشتر مرتبط با سویه‌های تولیدکننده‌ی آنزیم آگزوفولیاتیو می‌باشد (۳۰) که در سویه‌های مورد بررسی تحقیق حاضر نیز مشاهده نگردید. در پژوهش Gilot و van Leeuwen که در آمریکا انجام شد، فراوانی گروه‌های

## تشریح و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی با شماره‌ی ۱۲۲۰۳ و کد اخلاق IR.SBMU. MSP.REC.1396.412 مصوب معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

نوع I در بین ایزوله‌های آزمایش شده با فراوانی بیشتر توکسین، غالب بود و ممکن است برداشت شود که این نوع agr، نقشی ضروری در تنظیم سموم استافیلوکوکی دارد. پیشنهاد می‌شود برای درک شیوع و اپیدمیولوژی چسبندگی و ژن‌های سمی در انواع مختلف مولکولی *Staphylococcus aureus*، مطالعات بیشتری انجام گیرد.

## References

- Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis* 2008; 197(9): 1226-34.
- Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. *J Clin Microbiol* 2012; 50(11): 3581-5.
- Moodley A, Stegger M, Bagcigil AF, Baptiste KE, Loeffler A, Lloyd DH, et al. Spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(6): 1118-23.
- Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the mecC gene: Emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(1): 45-50.
- Honeyman AL, Friedman H, Bendinelli M. *Staphylococcus aureus* infection and disease. New York, NY: Springer; 2002.
- Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiol Res* 2006; 161(1): 49-54.
- Goudarzi M, Goudarzi H, Sa Figueiredo AM, Udo EE, Fazeli M, Asadzadeh M, et al. Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from intensive care units in Iran: ST22-SCCmec IV/t790 emerges as the major clone. *PLoS One* 2016; 11(5): e0155529.
- Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70(2): 631-41.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2233-9.
- Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11): 4060-7.
- dos Santos Soares MJ, da Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. *J Hosp Infect* 2000; 44(4): 301-8.
- Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, et al. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000; 355(1397): 667-80.
- Khan S, Rasheed F, Zahra R. Genetic polymorphism of agr locus and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* at two hospitals in Pakistan. *Pak J Med Sci* 2014; 30(1): 172-6.
- Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004-12. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(11): 2913-9.
- Javan A, Falahati HR, Saifi M, Talebi M, Ebrahimipour G, Pourshafi MR. MECA gene among high level methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Tehran hospitals. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2010; 15(49): 17-22. [In Persian].
- Melake NA, Zakaria AS, Ibrahim NH, Salama MA, Mahmoud AZ. Prevalence of Agr specificity groups among in vitro biofilm forming methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers. *International Journal of Microbiology Research* 2017; 5(2): 76-84.
- Guney AK, Yildirim T, Durupinar B. A study on class I integrons and antimicrobial resistance among clinical *Staphylococci* isolates from a Turkish hospital. *Clin Microbiol* 2014; 3:173.
- Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8: 22.
- Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Azad M, Goudarzi H, Azimi H. Distribution of spa types, integrons and associated gene cassettes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from intensive care units of hospitals in Tehran, Iran. *Arch Clin Infect Dis* 2016; 11(4): e38813.
- Havaei SA, Ghanbari F, Rastegari A, Azimian A, Khademi F, Hosseini N, et al. Molecular typing of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolated from Isfahan, Iran. *Int Sch Res Notices* 2014; 2014: 185272.

21. Wang WY, Chiueh TS, Sun JR, Tsao SM, Lu JJ. Molecular typing and phenotype characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from blood in Taiwan. *PLoS One* 2012; 7(1): e30394.
22. Wang SJ, Chow LW, Wu MJ. Multiplex PCR for the simultaneous detection of the SEA, SEB, SEC, SED and SEE genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. *J Food Drug Anal* 2002; 10(3):164-9.
23. Ko KS, Lee JY, Suh JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY, et al. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 421-6.
24. Norouzi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. The isolation and detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A-E and TSST-1 genes from different sources by PCR method. *Qom Univ Med Sci J* 2012; 6 (3):78-85. [In Persian].
25. Teyhoo M, Mobin H, Mozafari N A, Moadab S R, Sedigh Bayan KH, Mones Rast SH. The prevalence of toxin shock syndrome oxin (TSST-1) Producing clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Shohada Hospital in Tabriz, Iran. *Med Lab J* 2011; 5(1): 38-44. [In Persian].
26. Jimenez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodriguez EA, Garces CG, Patino LA, et al. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellin, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(8): 980-5.
27. Lim KT, Hanifah YA, Mohd Yusof MY, Thong KL. Investigation of toxin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. *Trop Biomed* 2012; 29(2): 212-9.
28. Nowrouzian FL, Dauwalder O, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, et al. Adhesin and superantigen genes and the capacity of *Staphylococcus aureus* to colonize the infantile gut. *J Infect Dis* 2011; 204(5): 714-21.
29. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. Several virulence factors of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Tehran. *Int J Enteric Pathog* 2015; 3(2): 8-25196.
30. Shopsis B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, et al. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 456-9.
31. Gilot P, van Leeuwen W. Comparative analysis of agr locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1265-9.
32. Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookkrung N, Chongsa-nguan M, Tungtrongchitr A, Voravuthikunchai SP, et al. *Staphylococcus aureus* clinical isolates: antibiotic susceptibility, molecular characteristics, and ability to form biofilm. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 314654.
33. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Nasiri MJ, Goudarzi H, Sajadi NR, 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: 328-35.
34. Ben Ayed S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ennigrou S, Ben Redjeb S. Accessory gene regulator (agr) typing of *Staphylococcus aureus* isolated from human infections. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2008; 85(1-4): 3-8.
35. Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. Detection of accessory gene regulator groups genes and cassette chromosome mec types among *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit patients. *Asian Pac J Trop Dis* 2015; 5(2): 153-7.

## Molecular Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Isolated from Patients Admitted to Intensive Care Units of Hospitals in Tehran City, Iran, Based on agr Pattern

Sara Nasirian<sup>1</sup>, Sara Saadatmand<sup>2</sup>, Mehdi Goudarzi<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Staphylococcus aureus is one of the most commonly diagnosed infections in hospitals. Increased infections caused by this bacterium and its resistance to many antibiotics is leading to increasing morbidity and mortality in the hospital setting. The aim of this study was to investigate the molecular status of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from patients admitted to intensive care units (ICUs) of hospitals in Tehran City, Iran.

**Methods:** This cross-sectional study was performed by analyzing 125 MRSA strains isolated from hospitalized patients in ICUs. In vitro antibiotic susceptibility testing of isolates was assessed using Kirby-Bauer disk diffusion method. MRSA strains were genetically typed by agr typing and virulence and adhesion genes profile via conventional polymerase chain reaction (PCR) method.

**Findings:** Of 443 clinical studied samples, 125 MRSA strains were observed. The highest resistance rates were observed for penicillin antibiotics (122, 97.6%), kanamycin (105, 84.0%), and gentamicin (95, 76.0%). Frequency of pvl and tst genes was 67.2% and 20%, respectively. Type I was the most prevalent agr type (52.0%), followed by type III (34.4%), type II (9.6%), type I 5 (5.3%), and type IV (4%). All the isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-encoding genes and high-level mupirocin-resistance (HLMUPR)-MRSA strains corresponded exclusively to agr type I.

**Conclusion:** This study demonstrates the increased resistance of Staphylococcus aureus to different antibiotics, which is a serious warning for the treatment of Staphylococcus aureus infection in the region. Therefore, in order to avoid resistance to other antibiotics, uncontrolled and unnecessary administration of antibiotics should be avoided.

**Keywords:** Staphylococcus aureus, Methicillin resistance, Molecular typing

**Citation:** Nasirian S. Saadatmand S. Goudarzi M. **Molecular Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Isolated from Patients Admitted to Intensive Care Units of Hospitals in Tehran City, Iran, Based on agr Pattern.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(451): 1424-31.

1- MSc Student, Department of Biology, School of Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran  
2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran  
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
**Corresponding Author:** Mehdi Goudarzi, Email: goudarzim@yahoo.com