فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۰، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۹۷- ۱۰۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

# جداسازی و شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های دستگاه تنفسی در شهرستان شهرکرد

**مریم رئیسی*:** دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، maryam_r335@yahoo.com
**الهه تاج بخش:** استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، ee_tajbakhsh@yahoo.com
**حسن ممتاز:** دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، hamomtaz@yahoo.com

## چکیده

**مقدمه:** *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی ازعوامل اصلی بیماری‌زا در انسان محسوب می‌شود که با درگیر کردن قسمت‌های مختلف بدن از جمله دستگاه تنفس باعث صرف هزینه‌های فراوان و طولانی شدن دوره درمان بیمار می‌شود. این مطالعه، با هدف جداسازی وبررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های فوقانی دستگاه تنفسی در شهرستان شهرکرد انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** این تحقیق، به شکل مقطعی- توصیفی بر روی ۲۰۰ نفر از افراد مشکوک به عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی مراجعه کننده به کلینیک امام علی شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۱ انجام شد. پس از جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از ترشحات بینی کشت داده شده، به منظور شناسایی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها، آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

**نتایج:** از ۲۰۰ نمونه مورد بررسی، در ۶۰ مورد (۳۰ درصد) آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* (در روش کشت و PCR) تعیین شد که در بررسی الگوی مقاومت ضدمیکروبی، بیش‌ترین مقاومت میکروبی به پنی سیلین و سفوتاکسیم (۱۰۰ درصد) و کم‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به وانکومایسین (۰/۵ درصد) برآورد شد. ژن *mecA* (کد کننده مقاومت به متی سیلین) با فراوانی ۸۵/۱۸ درصد و ژن *aacA-D* (کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها) با فراوانی ۲۸/۳۳ درصد بیش‌ترین و کم‌ترین ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی ردیابی شده در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** شیوع ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در افراد مبتلا به بیماری‌های دستگاه تنفسی لزوم کنترل دائمی ناقلین و درمان آن‌ها را برای جلوگیری از اشاعه این باکتری وعفونت‌های حاصل از آن را توصیه می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت دستگاه تنفسی

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

## مقدمه

*استافیلوکوکوس اورئوس*[1] یک کوکسی گرم مثبت دارای کروموزوم حلقوی است که ژن‌های بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی روی آن قرار دارد (۱ و ۲). *استافیلوکوکوس اورئوس* مهم‌ترین پاتوژن خانواده میکروکوکاسیه محسوب می‌شود که عامل بیش از ۸۰ درصد از موارد بیماری‌های چرکی و دومین عامل عفونت‌های بیمارستانی[2] (۳) بوده و همچنین، به عنوان عامل بیماری‌های سندرم فلسی شدن پوست (SSS)[3]، مسمومیت غذایی[4]، سندرم شوک سمی (TSS)[5]، باکتریمی[6]، اندوکاردیت[7] و پنومونی[8] شناخته شده است (۴). سویه‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز برخی *از استافیلوکوکوس‌های* کواگولاز منفی (CNS)[9] از عوامل عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های اکتسابی از جامعه در سراسر جهان هستند (۵).

تجویز نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها و مصرف بی رویه آن‌ها در انتخاب سوش‌های مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* نقش دارند (۶ و ۷). در سال ۱۹۴۲ بعضی از سوش‌های *استافیلوکوک* به پنی سیلین مقاوم شدند (۶). در طی یک دهه بعد سوش‌های مقاوم چندگانه به تتراسایکلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین گزارش شدند (۸ و ۹). برای نخستین بار در سال ۱۹۶۰ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA)[10] به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی معرفی شد (۱۰). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از عوامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه تنفسی مانند پنومونی است که این بیماری توسط آنتی‌بیوتیک‌های سیستمیک (وانکومایسین، کلیندامایسین یا سفالوسپورین‌های نسل اول) درمان می‌شود (۴ و ۱۱). از طرف دیگر، این باکتری قادر به مقاومت در برابر بیگانه خواری و ایمنی‌سلولی است (۱۲) و آنزیمی را تولید می‌کند که اکثر درمان‌های بر پایه پنی‌سیلین را بی اثر می‌کند (۴). سوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* علاوه بر آنتی‌بیوتیک متی سیلین، ممکن است نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگری مانند بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها، لینکوزامیدها، فلوروکوئینولون‌ها، استرپتوگرامین‌ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم باشند. به همین علت گاهی به درمان آنتی‌بیوتیکی پاسخ نمی‌دهند (۱۳ و ۱۴).

مقاومت علیه آنتی‌بیوتیک‌ها به وسیله مکانیسم‌های غیرژنتیکی (غیرفعال‌سازی آنزیماتیک دارو، تغییر سایت هدف ریبوزوم، کاهش نفوذ پذیری و پس زدگی دارو[11]) و مکانیسم‌های ژنتیکی (کانژوگاسیون[12]، ترانسفورماسیون[13] و ترانس داکسیون[14]) ایجاد می‌شود (۱۱). ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک *mecA* (متی‌سیلین)، *aacA-D* (آمینوگلیکوزیدها)، *tetM* و *tetK* (تتراسایکلین‌ها)، *msrA* و *msrB* (ماکرولیدها) در دهه اخیر در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شده که این ژن‌ها عملکردهای متفاوتی را انجام می‌دهند (۱۵ و ۱۶). ژن *mecA*، *PBP2a*[15] را کد می‌کند (۶)، ژن *aacA-D* آنزیم‌های دو عملکردی را کد می‌کند (۱۷)، ژن *msr(A,B)* در *استافیلوکوک‌ها* موجب مقاومت نسبت به ماکرولیدها و استرپتوگرامین‌های تیپ B می‌شود که به فنوتیپ MSLB[16] معروف است و بر روی فعالیت پمپ افلوکس تأثیر می‌گذارد (۱۷- ۱۹) و *tet(K,M)* که موجب تغییر سایت هدف و یا افلوکس می‌شود (۱۷). بنابراین، تشخیص ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با ویرولانس بالا به منظور استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان مؤثر ضروری است (۱۵- ۱۷).

هدف از این تحقیق، ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله ژن‌های مقاومت به متی سیلین (*mecA*)، ماکرولیدها (*msrA, msrB*)، آمینوگلیکوزیدها (*aacA-D*) و تتراسایکلین‌ها (*tetM, tetK*) با تکنیک مولتی پلکس PCR در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد عفونت‌های دستگاه تنفسی در شهرستان شهرکرد است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری و جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*

تعداد ۲۰۰ نمونه سواب بینی از افراد مشکوک به عفونت‌های قسمت فوقانی دستگاه تنفس (رینیت[۱۷]، لارنژیت[۱۸]، تراکئیت[۱۹] و غیره ... ) اخذ شد. نمونه‌ها با استفاده از سواب استریل از قسمت قدامی بینی افراد بیمار مراجعه کننده به کلینیک امام علی شهرستان شهرکرد در طول ۶ ماهه دوم سال ۱۳۹۱ اخذ و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط پپتون واتر (مرک، آلمان)[۲۰] کشت داده شدند. پس از غنی‌سازی اولیه، نمونه‌های رشد کرده در محیط‌های جامد بلاد آگار (مرک، آلمان)[۲۱] و مانیتول سالت آگار (های مدیا، هند) [۲۲] کشت داده شد. روی پرگنه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* آزمایش‌هایی مانند: رنگ‌آمیزی گرم[۲۳]، کاتالاز[۲۴]، کواگولاز[۲۵] و دزاکسی ریبونوکلئاز[۲۶]انجام و باکتری‌های جداشده پس از شناسایی به عنوان ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، برای مطالعات بعدی در محیط مایع مغز و قلب (BHI) (مرک، آلمان) [۲۷] کشت و نگهداری شدند (۲۰-۲۲).

### آزمایش‌های مولکولی

به منظور تائید قطعی وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های کشت داده شده و ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها، از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) [۲۸] استفاده شد. در این راستا، ابتدا DNA ژنومی باکتری‌های رشد یافته در محیط BHI با استفاده از کیت استخراج DNA (فرمنتاز، آلمان) [۲۹]، استخراج و در دو مرحله آزمایش PCR روی DNA تخلیص شده انجام شد:

در مرحله اول، حضور قطعی *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایزوله‌ها با ردیابی ژن کد کننده *16S rDNA* باکتری با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام شد. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر بافر PCR[۳۰] (10x)، ۲۰۰ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۲ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای R و F، ۱ واحد آنزیم DNATaq پلیمراز (سیناژن، ایران) [۳۱] و ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه تنظیم و با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۶ دقیقه یک سیکل، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه ۵۰ ثانیه، ۶۱ درجه ۷۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۸ دقیقه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مستر سایکلر گرادیانت (اپندرف، آلمان) [۳۲] انجام شد.

در مرحله دوم، ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل: ژن‌های *mecA* (مقاومت به متی‌سیلین)، *aacA-D* (مقاومت به آمینوگلیکوزیدها)، *tetM* و *tetK* (مقاومت به تتراسایکلین) و *msrA* و *msrB* (مقاومت به ماکرولیدها) به روش PCR چندگانه ای با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ به شرح زیر انجام شد:

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R مربوط به هر ژن، ۱/۵ واحد آنزیم DNA Taq پلیمراز و ۵ میکرولیتر DNA هر نمونه بود. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل:

یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۶ دقیقه، ۳۴ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه ۷۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه.

پس از انجام آزمایش‌های PCR، محصول PCR روی ژل ۱درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید[۳۳] در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت در حضور نشانگر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویر بردار از ژل (انگلستان، یووی تک[۳۴]) بررسی شد (۲۰).

**آزمایش آنتی‌بیوگرام**

به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از روش کربی بائر[۳۵] (انتشاراز دیسک) طبق دستورالعمل NCCLS[۳۶] (۲۰۰۶) استفاده شد. برای این منظور باکتری‌های جدا شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط جامد مولر هینتون آگار (های مدیا، هند) [۳۷] در حضور دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی پنی سیلین (۱۰ واحد)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، جنتامیسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، ریفامپین (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، کلوگزاسیلین (۵ میکروگرم)، وانکومایسین (۳۰ میکروگرم)، آموکسی کلاو (۳۰ میکروگرم)، سفالکسین (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و متی سیلین (۵ میکروگرم) (شرکت پادتن طب) در دمای ۳۷ درجه کشت و با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر تعیین و ثبت شد (۲۲ و ۲۳).

**تجزیه و تحلیل آماری**

داده‌های حاصل از مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری اس.پی.اس.اس[۳۸] و مدل‌های آماری کای اسکوار و دقیق فیشر ارزیابی شده و وجود ارتباط بین حضور انواع ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و الگوی مقاومت ضدمیکروبی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های قسمت فوقانی دستگاه تنفس تعیین شد. در این راستا، وجود ($P\ value < 0.05$) به عنوان وجود رابطه آماری معنی‌دار بین دو عامل مورد مطالعه در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از دستگاه تنفسی (۲۰)

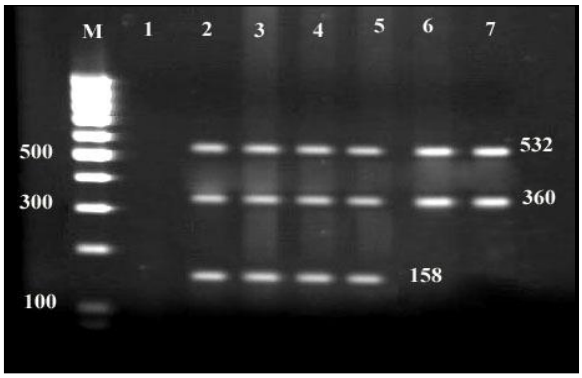
| ژن | توالی پرایمرها | اندازه محصول (bp) |
|---|---|---|
| *mecA* (متی سیلین) | F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC<br>R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC | ۵۳۲ |
| *aacA-D* (آمینوگلیکوزیدها) | F: TAATCCAAGAGCAATAAGGGC<br>R: GCCACACTATCATAACCACTA | ۲۲۷ |
| *tet K* (تتراسایکلین‌ها) | F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT<br>R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA | ۳۶۰ |
| *tet M* (تتراسایکلین‌ها) | F: AGTGGAGCGATTACAGAA<br>R: CATATGTCCTGGCGTGTCTA | ۱۵۸ |
| *msrA* (ماکرولیدها) | F: GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG<br>R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT | ۹۴۰ |
| *msrB* (ماکرولیدها) | F: TATGATATCCATAATAATTATCCAATC<br>R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT | ۵۹۵ |
| *16S rDNA* | F: GTAGGTGGCAAGCGTTACC<br>R: CGCACATCAGCGTCAG | ۲۲۸ |

## نتایج

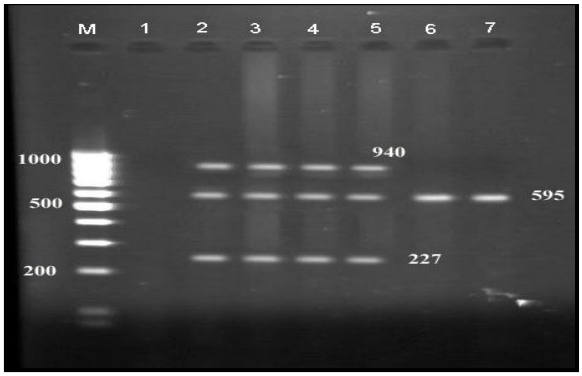
از مجموع ۲۰۰ بیمار مورد مطالعه در ۶۰ مورد (۳۰ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* از ترشحات بینی جدا و با انجام آزمایش PCR وجود قطعی آلودگی اثبات شد. در آزمایش آنتی‌بیوگرام برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های بالینی تنفسی در انسان استفاده شد که همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، تمام ایزوله‌ها نسبت به دو آنتی‌بیوتیک پنی سیلین و سفوتاکسیم مقاوم بودند. در این آزمایش ۵۸/۳۳ درصد از ایزوله‌ها نسبت به تتراسایکلین و تنها ۰/۵ درصد از آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک وانکومایسین مقاوم بودند.

در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از جدول ۲ اختلاف آماری معنی‌دار بین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به پنی سیلین و سفوتاکسیم با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها ($P$ *value*= 0.015) و نیز بین مقاومت به تتراسایکلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها ($P$ *value*= 0.026) مشاهده شد. در تحلیل آماری این اطلاعات، اختلاف آماری معنی‌داری بین جنسیت و حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین، نوع عفونت و حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* با ($P$ *value*<0.05) مشاهده نشد.

برای ردیابی برخی از ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله ژن‌های کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها، تتراسایکلین و متی‌سیلین از آزمایش PCR چندگانه استفاده شد. همان گونه که در جدول ۲، مشهود است، شایع‌ترین ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های مورد مطالعه ژن *mecA* با ۸۵/۱۸ درصد فراوانی و نادرترین آن‌ها ژن کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها (*aacA-D*) ۲۸/۳۳ درصد بود. در تحلیل آماری این اطلاعات، اختلاف آماری معنی‌دار بین فراوانی حضور دو ژن *mecA* و *tetK* با ژن *aacA-D* در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده شد ($P$ *value*=0.0364). نتایج الکتروفورز ژل آگاروز حاصل از PCR چندگانه ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی درایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از دستگاه تنفسی در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شوند.




شکل۱- تصویر الکتروفورز ژل آگاروز PCR چندگانه مربوط به ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جداشده از دستگاه تنفسی. *mecA* (۵۳۲ جفت باز)، *tetK* (۳۶۰ جفت باز) و *tetM* (۱۵۸ جفت باز) ؛ **ستون M:** DNA نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، **ستون ۱:** کنترل منفی، **ستون‌های ۲-۷:** نمونه‌های مثبت.




شکل۲- تصویر الکتروفورز ژل آگاروز PCR چندگانه مربوط به ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس‌های*جداشده از دستگاه تنفسی. *msrA* (۹۴۰ جفت باز)، *msrB* (۵۹۵جفت باز) و *aacA-D* (۲۲۷ جفت باز)، **ستون M:** DNA نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، **ستون ۱:** کنترل منفی، **ستون‌های ۲-۷:** نمونه‌های مثبت.

جدول۲- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از دستگاه تنفسی

| آنتی‌بیوتیک | مقاومت (با روش انتشار از دیسک) (درصد) | مقاومت با روش بررسی ژن‌های مقاومت درPCR | |
|---|---|---|---|
| پنی سیلین و سفوتاکسیم | ۱۰۰ | – | – |
| تتراسایکلین | ۵۸/۳۳ | *tetM*= ۵۸/۳۳ درصد | *tetK*= ۷۳/۳۳ درصد |
| اگزاسیلین | ۴۰ | – | – |
| کلوگزاسیلین | ۴۰ | – | – |
| سیپروفلوکساسین | ۲۵ | – | – |
| سفتازیدیوم | ۲۵ | – | – |
| سفالوتین | ۲۰ | – | – |
| جنتامایسین (آمینوگلیکوزیدها) | ۱۶/۶۶ | *aacA- D*= ۲۸/۳۳ درصد | – |
| آموکسی کلاو | ۶/۶۶ | – | – |
| ماکرولیدها | – | *msrA*= ۳۸/۳۳ درصد | *msrB*= ۴۰ درصد |
| اریترومایسین | ۵ | – | – |
| کوتریماکسازول | ۵ | – | – |
| ریفامپین | ۵ | – | – |
| سفالکسین | ۳/۳۳ | – | – |
| وانکومایسین | ۰/۵ | – | |
| متی سیلین | ۴۸ | *mecA*= ۸۵/۱۸ درصد | – |

## بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر، با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ترشحات بینی افراد مشکوک به عفونت‌های دستگاه تنفس فوقانی مراجعه کننده به کلینیک امام علی شهرستان شهرکرد با دو روش معمول آنتی‌بیوگرام و مولکولی PCR انجام شد.

از مجموع ۲۰۰ نمونه مورد مطالعه در ۶۰ نمونه (۳۰ درصد) آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت شد که در آزمایش آنتی‌بیوگرام تمام این ایزوله‌ها نسبت به پنی سیلین مقاوم بودند.

صادری[۳۹] و همکاران در سال ۸۲-۱۳۸۱ در ۸۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (*MRSA*) جدا شده از بینی، مقاومت به پنی سیلین را ۹۰/۸ درصد گزارش کردند (۲۴). تی وادروس[۴۰] و گدبو[۴۱] در سال ۱۹۸۴ میزان مقاومت به پنی سیلین را در ۱۰۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ترشحات بینی در افراد مراجعه کننده به بیمارستان ۸۶/۲ درصد برآورد کردند (۲۵). توکلی[۴۲] و همکاران در سال ۱۳۸۰تمام سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده در مطالعه خود را مقاوم به پنی سیلین گزارش دادند (۲۶).

حساسیت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده به سفالکسین در مطالعه حاضر ۹۶/۶۷ درصد تعیین شد. این در حالی است که در مطالعه صفدری[۴۳] و همکاران در سال ۱۳۹۱در بیمارستان قائم مشهد این میزان ۵۷ درصد (۲۷)، در مطالعه توکلی و همکاران ۸۱/۶ درصد و در مطالعه قاسمیان[۴۴] و همکاران در سال ۱۳۸۳، ۶۹/۴ درصد گزارش شد (۲۶ و ۲۸) ایزوله‌های

*استافیلوکوکوس اورئوس* در مطالعه حاضر ۹۵ درصد حساسیت به اریترومایسین و ۹۹/۵ درصد حساسیت به وانکومایسین نشان دادند. رشیدیان[۴۵] و همکاران در مطالعه خود در سال ۱۳۸۰ که در بیمارستان بعثت سنندج انجام شد حساسیت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده را به اریترومایسین ۵۹ درصد و قاسمیان و همکاران در سال ۱۳۸۳ حساسیت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به وانکومایسین را ۴۴/۴ درصد برآورد کردند (۲۸ و ۲۹).

در مورد دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نیز نتایج مشابه یا متفاوتی با دیگر محققان از ایران یافت شد که این اختلافات می‌تواند ناشی از اختصاصات بومی هر منطقه، روش به کار رفته برای تعیین میزان حساسیت و عوامل دخیل در ایجاد مقاومت دارویی از جمله پلاسمیدهای قابل انتقال و غیره... باشد. در مجموع تمام ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی در مطالعه حاضر دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک مختلف هستند که این خود خطر استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها را در سطح جامعه دو چندان می‌کند.

در قسمت دیگر از این تحقیق، ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شدند و از روش PCR چندگانه برای ردیابی ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد که نتایج نشان داد ژن *mecA* (کد کننده مقاومت به متی سیلین) در ۸۵/۱۸ درصد از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ترشحات بینی وجود دارد.

استرومنگر[۴۶] و همکاران در سال ۲۰۰۳ در آلمان از روش PCR چندگانه برای ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کردند و نشان دادند که ژن‌های *tetM*، *tetK*، *aacA-D* و *mecA* به ترتیب در ۲۶/۶۶، ۱۶/۶۶، ۶۶/۳۳ و ۹۳/۳۳ درصد از ایزوله‌ها وجود دارد اما هیچ کدام از آن‌ها حامل ژن‌های *vatA* و *vatB* نیستند (۳۰).

حیدری[۴۷] و همکاران در سال ۲۰۰۱ فراوانی حضور ژن‌های *mecA*، *msrA*، *msrB*، *aacA-D*، *tetK* و *tetM* را در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های بالینی انسان و ورم پستان در گاو را به ترتیب ۸۵/۱۸، ۴۶/۲۹، ۴۹/۰۷، ۳۳/۳۳، ۸۰/۵۰ و ۶۶/۶۶ درصد تعیین کردند (۲۰).

در مجموع، نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه آن با سایر تحقیقات انجام شده در ایران و جهان نشان می‌دهد که اکثر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد مختلف عفونت‌های بالینی در انسان و دام نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌ها مقاوم هستند که این مقاومت می‌تواند ریشه کروموزومی یا پلاسمیدی داشته باشد. بنابراین، استفاده از روش مولکولی نظیر PCR برای ردیابی سریع ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها از جمله *استافیلوکوکوس* ضروری به نظر رسیده و نتایج حاصل از این کار می‌تواند در انتخاب دقیق آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان و جلوگیری از گسترش بیشتر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها کمک شایانی نماید.

**تشکر و قدردانی**

از کمک‌های جناب آقای دکتر ممتاز دانشیار محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که در انجام این پژوهش، ما را یاری کردند و همچنین، از جناب آقای مؤمنی کارشناس مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد برای همکاری صمیمانه ایشان در مراحل انجام آزمایش تشکر و قدردانی می‌شود.

## References


(1) Kloos WE. Staphylococcus. In: Mahy BWJ, Collier L, Balows A, Sussman M. *Toply & Wilsons Microbiology and Microbial Infection*. 9th ed. USA: Hodder Education Publishers; 1998.

(2) De Bruijn FJ, Lupski JR, Weinstock GM. The *Staphylococcus aureus* genome map. In: Iandolo JJ, Stewart GC. *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis.* New York: Springer; 1998.

(3) Walker T. S. *Cocos* stain- causing Gram-positive. In: Bahdor A, Alikhani M. Y, Mansouri S. H, Dogahe H. P. *Microbiology Walkers.* Taheri Kalani M. Tehran: Khosravi publications with Cooperation Dibaj Posted; 2008. p 151- 93.

(4) Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS,Pfaller MA. *Staphylococcus*. In: Murray PR, Rosenthal KS, KobayashiGS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 4thed. Washington: Mosby; 2002. p 202- 16.

(5) Naimi TS, LeDell KH, Boxrud DJ, Groom AV, Steward CD, Johnson SK, et al. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clin Infect Dis* 2001 1;33 (7): 990- 6.

(6) Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus. J clin Invest* 2003; 111 (9): 1265- 73.

(7) Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post- antimicrobial Era. *Science* 1992; 257 (5073): 1050- 55.

(8) BarberM, Rozwadowska- DowzenkoM. Infection by penicillin- resistant *staphylococci*. *Lancet* 1948; 2 (6530): 641- 4.

(9) Kirby WM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *staphylococci*. *Science* 1944;99 (2579): 452-3.

(10) Ramdani- Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, et al. Detection of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemothe r* 2006; 50 (3): 1083- 5.

(11) Walker, Stuart T. Cocos stain- causing Gram- positive. In: Bahador A, Alikhani MY, Mansouri SH, PiriDogahe H, TaheriKalani M. *Walkers Microbiology*. Tehran: khosravi publications & Dibaj publications; 2007. p 151- 93.

(12) Yilmaz G, Aydin K, Iskender S, Caylan R, Koksal I. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in *staphylococci*. *J Med Microbiol* 2007; 56 (Pt 3): 342- 5.

(13) Chambers HF. Coagulase- negative *staphylococci* resistant to beta- lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob Agents Chemother*1987; 31 (12): 1919- 24.

(14) Chambers HF. Methicillin resistance in *staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10 (4): 781- 91.

(15) Wang Y, Cong- Ming Wu, Li- Ming Lu, Gao- Wa Na Ren, Xing- Yuan Cao, Jian-ZhongShen. Macrolide–lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol* 2008; 130 (1–2): 118- 25.

(16) Ochoa- Zarzosa A, Loeza- Lara PD, Torres- Rodríguez F, Loeza- Angeles H, Mascot- Chiquito N, Sánchez- Baca S, et al. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; 94 (2): 199- 206.

(17) Kumar R, Yadav BR, Singh RS. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *CurrMicrobiol* 2010;60 (5): 379- 86.

(18) NaderiNasab M, Farshadzadeh Z, Yosefi F, Sasacn MS. Determination of inducible resistance to clindamycin in methicillin-resistant *staphylococcus aureus* and *coagulase* negative *staphylococci*. *Iran J Microbiol* 2008; 1 (3): 25- 30.

(19) Merino- Díaz L, Cantos de la Casa A, Torres- Sánchez MJ, Aznar- Martín J. Detection of inducible resistance to clindamycin in cutaneous isolates of *Staphylococcus spp*. by phenotypic and genotypic methods. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25 (2): 77- 81.

(20) Heidari M, Momtaz H, Madani M. Detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolated from human infections and bovine mastitis. *African JMicrobiol Res* 2011; 5 (31): 5745-49.

(21) Momtaz H, Tajbakhsh E, Rahimi E, Momeni M. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and sub- clinical bovine mastitis in Isfahan and ChaharmahalvaBakhtiari provinces of Iran. *Comp ClinPath* 2011; 20: 519– 22.

(22) Karamstaji A, Moradi N, Boushehri E, Jahed M, Dadsetan B, Sanginabadi F, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance patterns in Staff training hospitals treatment of Bandar Abbas. *Hormozgan Univ Med J* 2009; 12 (2): 95- 101.

(23) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J clin Pathol* 1966; 45 (4): 493- 6.

(24) Saderi H, Olia P, Zafarghandi N, Jalalinadoshen M. Antibiotic Resistance of*Staphylococcus aureus* isolated from nasal personnel in Shahedhospitals2003- 2004. *MazandaranUniv Med J* 2005; (42): 69- 75.

(25) Tewodros W, Gedebou M. Nasal carrier rates and antibiotic resistance of *staphylococcusa ureus* isolates from hospital and non- hospital populations, Addis Ababa. *TransR Soc Trop Med Hyg* 1984; 78 (3): 314-18.

(26) Tavakoli A, Yazdani R, Bakaeiyan M. Comparison of coagulase- positive *staphylococci* resistant to beta- lactam antibiotics. *Zahedan Univ Med J* 2002; 3 (10): 1- 5.

(27) Safdari H, Sadeghian A, Tahaghogi S. The Antibiotic Resistance Pattern of *Staphylococcus aureus* Isolated From Patients in Quaem University Hospital During 2009-2011. *Mashhad Med J* 2012; 1 (1): 39- 41.

(28) Ghassemian R, Najafi N, Shojaeifar A. The prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal carriers and pattern Antibiotic resistance in the Employee Training Center –Razi Ghaem Shahr City in fall 2004. *Mazandaran Univ Med J* 2004; 14 (44): 79- 86.

(29) Rashidiyan M,Taherpour A, Godarzi S. The frequency of nasal carriers of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical staff inBesat hospital and resistance to antibiotics of strains isolated. *Kurdistan Univ Med J* 2002; 6 (21): 2- 6.

(30) Strommenger B, Kettlitz CH, Werner G, Witte W. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genesin *Staphylococcusaureus*. *J clin Microbiol* 2003; 41 (9): 4089- 94.

[1]- *Staphylococcus aureus*
[2]- Nosocomial infections
[3]- Scalded Skin Syndrome
[4]- Food poisoning
[5]- Toxic Shock Syndrome
[6]- Bacteriema
[7] -Endocarditis
[8]- Pneumonia
[9]- Coagulase negative Staphylococci
[10]- Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
[11]- Efflux
[12]- Conjugation
[13]- Transformation
[14]- Transduction
[15]- PenicillinBindingProtein 2a
[16]- Macrolide- Lincosamide- StreptograminB
[17]- Rhinitis
[18]- Laryngitis
[19]- Tracheitis
[20]- Peptone water (Merck, Germany)
[21]- Blood agar (Merck, Germany)
[22]- Mannitol Salt Agar (HiMedia, india)
[23]- Gram stain
[24]- Catalase
[25]- Coagulase
[26]- DNase Test
[27]- Brain Heart Infusion (merck, Germany)
[28]- Polymerase Chain Reaction
[29]- DNA extraction kit (fermentas, Germany)
[30]- PCR buffer
[31]- DNA Taq polymerase (cinna gene)
[32]- Thermocycler Master Cycler Gradient (eppendorf, Germany)
[33]- Ethidium Bromide
[34]- Uviteck
[35]- Kirby-Bauer
[36]- National Committee for Clinical Laboratory Standards
[37]- Muller Hinton Agar (HiMedia, India)
[38]- SPSS (ver 16)
[39]- Saderi
[40]- Tewodros
[41]- Gedebou
[42]-Tavakoli
[43]- Safdari
[44]- Ghasemian
[45]- Rashidian
[46]- Stromenger
[47]- Heydari

# Isolation and identification of antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolates from respiratory system infections in shahrekord, Iran

**Maryam Reisi** *
M.Sc. Student of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Iran, maryam_r335@yahoo.com
**Elahe Tajbakhsh**
Assistant Professor of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Iran, ee_tajbakhsh@yahoo.com
**Hassan Momtaz**
Associate Professor of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Iran, hamomtaz@yahoo.com

## Abstract

**Introduction**: *Staphylococcus aureus* is considered as one of pathogenic agents in humans, that engages different body parts including respiratory system and causes to spend lots of costs and extending patient's treatment period. This study which is performed to separate and investigate the pattern of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from upper respiratory system infections in Shahrekord.

**Materials and methods:** This study was done by sectional-descriptive method On 200 suspicious persons to the upper respiratory system infections who were referred to the Imam Ali clinic in Shahrekord in 2012. After isolation of *Staphylococcus aureus* from cultured nose discharges, antibiotic resistance genes were identified by polymerase chain reaction (PCR) by using defined primer pairs.

**Results**: Among 200 investigated samples in 60 cases (30%) *Staphylococcus aureus* infection (by culturing and *PCR* method) was determined. Isolates showed the lowest amount of antibiotic resistance to vancomycin (0.5%) and the highest amount of resistance to the penicillin G and cefotaxime (100%). *mecA* gene (encoding methicillin resistance) with frequency of 85.18% and *aacA-D* gene (encoding resistance to aminoglycosides) with frequency of 28.33% showed the highest and lowest frequency of antibiotic resistance genes coding in *Staphylococcus aureus* isolates respectively.

**Discussion and conclusion**: Notable prevalence of resistant *Staphylococcus aureus* isolates in community acquired respiratory infections, recommend continuous control necessity to impede the spreading of these bacteria and their infections.

**Key words:** Antibiotic resistance genes, *Staphylococcus aureus*, Respiratory system infection

* Corresponding author
**Received:** July 28, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013