

مقاله پژوهشی

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

حورا پورغفار^۱، نور امیرمظفری^{۲*}، معصومه انوری^۳

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۸/۲۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس لکوسیدین پنتون والنیتین (pvl) مثبت دارای ویروانس بالایی بوده و بیشتر با آبسه‌های پوستی و عفونت‌های نکروتیک شدید همراه می‌باشند. مطالعه حاضر، بررسی فراوانی ژن pvl و مقاومت به متی سیلین (MRSA) در بیماران بیمارستان‌های رشت در شمال ایران است. **مواد و روش‌ها:** تعداد ۹۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس در طی شش ماه نمونه‌گیری به دست آمد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش Disk Diffusion انجام شد و تست مقاومت به متی سیلین به وسیله دیسک اگزاسیلین انجام گردید. سنجش ژن pvl برای تمامی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد، سپس نمونه‌های مثبت که دارای ژن pvl بودند، جهت جستجوی ژن mecA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن مورد بررسی قرار گرفتند.

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

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

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، لکوسیدین پنتون والنیتین، MRSA، mecA

مقدمه

مهم‌ترین راه انتقال این باکتری به‌ویژه در مراکز درمانی، دست‌های آلوده است (۱ و ۲).

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

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

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

مثبت با سویه‌های مقاوم به متی سیلین مرتبط است، در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. بنابراین با توجه به اهمیت آن، هدف از این مطالعه ارزیابی، فراوانی ژن *pvl* در بین سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیمارستان‌های شهر رشت و بررسی حضور ژن *mecA* برای تأیید سویه‌های MRSA در میان نمونه‌های دارای ژن *pvl* می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

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

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

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

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

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

Panton و Valentine در سال ۱۹۳۲ توکسین لوکوسیدین پنتون والنتن را از یک بیمار مبتلا به فورونکلوزیس (Furunculosis) جداسازی نمودند (۶). پنتون والنتن یک گاما توکسین شامل دو جزء S (۳۸ کیلو دالتون) و F (۳۲ کیلو دالتون) است که تحت کنترل ژن‌های *luk/PV* و *lukf/PV* است (۷). این توکسین توسط یک باکتریوفاژ حمل می‌شود و قابل انتقال به سایر استافیلوکوکوس‌ها است. پنتون والنتن علیه غشای خارجی سلول‌های پلی مورفونوکلئار، مونوسیت‌ها و ماکروفاژهای انسانی عمل می‌کند و بسته به غلظت توکسین، باعث باز شدن کانال‌های کلسیم می‌شود (۸ و ۹). ژن‌های *luk/PV* و *lukf/PV* می‌توانند توسط سویه‌های مقاوم به متی سیلین (MRSA) و حساس به متی سیلین (MSSA) حمل شوند (۱۰). با توجه به این که مطالعات مختلف، افزایش انواع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را نشان می‌دهد و استافیلوکوکوس اورئوس PVL

بیمارستان‌های شهر رشت جمع‌آوری شد. فراوانی نمونه‌ها برحسب نوع نمونه در جدول ۱ آمده است. با استفاده از آزمون‌های میکروبی، رنگ‌آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت آگار،

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

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

آزمون‌های کاتالاز و کوآگولاز، مورد تأیید قرار گرفتند. **ارزیابی حساسیت میکروبی:** نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که از ۹۲ جدایه موردبررسی، ۴۳ جدایه (۴۶/۴ درصد) نسبت به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین مقاوم بودند و به‌عنوان MRSA در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۳۰/۴۳ درصد، لینوزولید ۲۸/۲۶ درصد، جنتامایسین ۲۳/۹۱ و تتراسیکلین ۲۲/۸۲ درصد مشاهده شد. بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین ۶۵/۲۱ درصد گزارش گردید. در مجموع میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه جداسازی شده از نمونه‌های ادرار و زخم بیشتر از خون و پوست بود (جدول ۲). نتایج تکثیر ژن *mecA* (۱۴۶ pb) و ژن *pvl* (۵۷۵ pb) در شکل ۱ ذکر شده است. از مجموع ۹۲ جدایه نمونه جداسازی شده

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

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR): به‌منظور تکثیر ژن *mecA* (۱۴۶pb) از پرایمرهای اختصاصی با توالی زیر استفاده گردید (۱۲).

mecA -F: 5'GTGAAGATATACCAAGTGATT3'

mecA -R: 5'ATGCGCTATAGATTGATTGAAAGGA

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

LukS-PV-F: 5'AGAAGATACAAGTAGCGATAAGTG3'

LukS-PV-R: 5'AAGGATTGAAACCACTGTGTAC3'

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

تجزیه و تحلیل آماری: برای این منظور از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد.

نتایج

جداسازی و تشخیص نمونه‌های بالینی: در این مطالعه در مجموع ۹۲ نمونه ادرار، خون، پوست و زخم از آزمایشگاه‌ها و

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

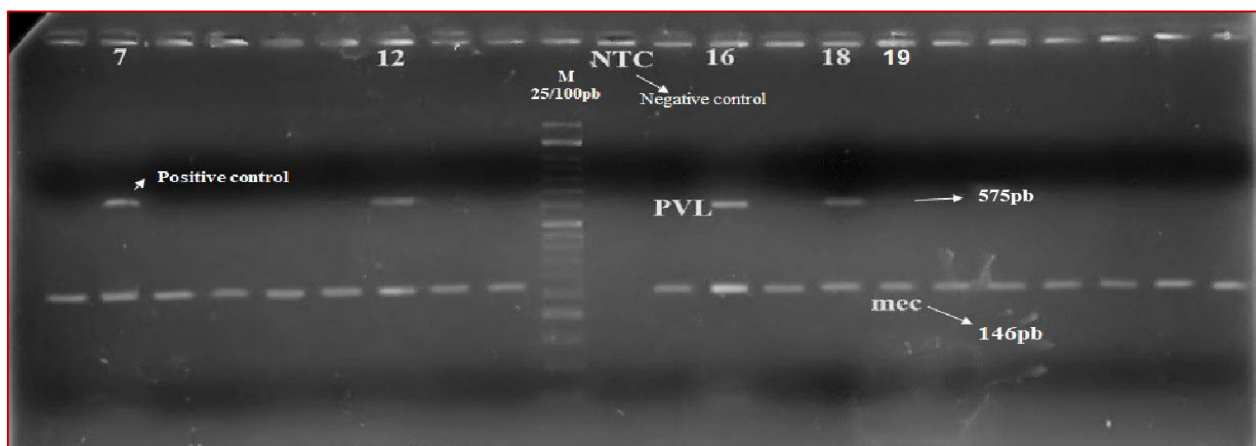
استافیلوکوکوس اورئوس، فراوانی ژن *mecA* ۸ جدایه ۸/۷ درصد) و ژن *pvl* ۱۸ جدایه (۱۹/۵۶ درصد) بودند. لازم به ذکر است، فراوانی ژن *mecA* در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه‌های زخم بیشتر از سایر نمونه‌ها بود. در میان ۱۸ جدایه *pvl* مثبت، ۱۵ جدایه (۸۳/۳۳ درصد) MRSA و ۳ جدایه (۱۶/۶۶ درصد)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

بحث

امروزه مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشکلات فراوانی را در درمان بیماری‌های ناشی از این ارگانیسم در نقاط مختلف جهان ایجاد

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

آنتی بیوتیک		مقاوم		نیمه حساس		حساس	
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۲	(۲/۱۷)	۳۰	(۳۲/۶)	۶۰	(۶۵/۲۱)		
۴۳	(۴۶/۴)	۲۵	(۲۷/۱۷)	۲۵	(۲۷/۱۷)		
۱۲	(۱۲/۰۴)	۳۶	(۳۹/۱۳)	۴۴	(۴۷/۱۸۲)		
۲۲	(۲۳/۹۱)	۳۱	(۳۳/۶۹)	۳۹	(۴۲/۳۹)		
۲۱	(۲۲/۸۲)	۴۵	(۴۸/۹۱)	۲۶	(۲۸/۲۶)		
۲۸	(۳۰/۴۳)	۱۶	(۱۷/۳۹)	۴۸	(۵۲/۱۷)		
۱۴	(۱۵/۲۱)	۴۵	(۴۸/۹۱)	۳۳	(۳۵/۱۸۶)		
۲۶	(۲۸/۲۶)	۲۹	(۳۱/۵۲)	۳۷	(۴۰/۲۱)		



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



۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی ۱۸ درصد گزارش دادند (۲۵).

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

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

نتیجه‌گیری

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

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

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

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

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

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

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

از ۲۰۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس که از بیمارستان‌های چین در سال ۲۰۱۳ جمع‌آوری شده بود، ۴/۹ درصد دارای ژن *pvl* بودند (۱۸). ملاعباس زاده و همکاران شیوع ژن *pvl* را در

مناسب برای شناسایی صحیح عامل عفونت احساس می‌شود، که به تشخیص سریع و کنترل به موقع سویه‌های مولد ژن *pvl* و سایر توکسین‌ها، تایپینگ مولکولی سویه‌های MRSA و بررسی وجود ژن‌های دیگر مقاومت در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس MRSA کمک خواهد نمود.

تشکر و قدردانی

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

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نمی‌نمایند.

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

نتایج به دست آمده بر این نکته تأکید می‌کند که میزان حساسیت یا مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی در نقاط مختلف جغرافیایی جهان متفاوت است و اطلاعات محدودی در مورد میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در برخی از شهرهای ایران وجود دارد. با توجه به کاهش روزافزون حساسیت این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل بهینه در مصرف آن‌ها نقش مهمی در جلوگیری از سوش‌های مقاوم خواهد داشت. عفونت با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بسیار شایع بوده و توکسین‌های تولیدشده توسط این باکتری مشکلات و معضلات فراوانی را در سطح جامعه به وجود می‌آورند و همچنین به دلیل بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیک، درمان آن نیز یکی از مشکلات بهداشتی است. بنابراین ضرورت استفاده از روش‌های تشخیصی

References

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



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



30. Motamedi H, Rahmat Abadi S. The Association of panton-valentine leucocidin and *mecA* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates

from patients referred to educational hospital in Ahvaz, Iran. Jundishapur J Microbial. 2015; 8(8): e22021. [In Persian]



Original Article

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

Pourghafar H¹, Amirmozafari N^{2*}, Anvari M³

1. Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Science Tehran, Iran

3. Department of Microbiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 25 Apr 2019

Accepted: 16 Nov 2019

Abstract

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

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

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

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

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Pantone Valentine Leukocidin, *mecA*, MRSA

*Corresponding Author: Amirmozafari Noor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Science Tehran, Iran

Email: amirmozafari@iums.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0001-5186-8406>