Original Article

An Investigation of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Gene in Methicillin-Resistant Clinical Strains of Staphylococcus aureus using Multiplex PCR Method

Mohammad Bokaeian[1], Hamed Tahmasebi[2], Shahram Shahraki Zahedani[1], Javad Adabi[2]*

[1]*Center for Tropical Infectious Diseases, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Hamed Tahmasebi,
Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

Email:
h.tahmasebi87@yahoo.com

Received: 15 Mar, 2016

Accepted: 9 Apr, 2016

Abstract

***Background and Objectives*:** Toxins produced by the bacteria are one of the most common cases, which can, together with other bacterial pathogens, cause or aggravate the disease. One of the diseases caused by bacterial toxins, is toxic shock syndrome. The *tst* gene encodes this toxin that can be easily transferred between different strains of *Staphylococcus aureus*. In this study, toxic shock syndrome toxin-1 gene was investigated in methicillin-resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR method.

***Methods*:** This study is a cross-sectional study, during a 9 month period, 470 samples were collected from patients hospitalized in different wards of treatment centers of Zahedan University of Medical Sciences in 2015. Phenotypic method was used for isolation and initial screening. Oxacillin and Cefoxitin discs were used. After isolation of resistant strains, *femA* and *mecA* genes and tst gene were investigated using phenotypic method and multiplex PCR method, respectively.

***Results*:** Of 170 clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, 93 isolates were phenotypically methicillin-resistant, among which 89 isolates had *mecA* gene and 14 isolates had *tst* gene.

***Conclusion*:** The results indicated that the prevalence of methicillin-resistant strains and the strains carrying causative gene for TSST1, is high in Zahedan. Also, circulation of these isolates can lead to much more severe effects in individuals with weak immune system.

***Keywords*:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; toxic shock syndrome toxin-1 gene; Enterotoxins; Drug resistance.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره ۱، فروردین ۹۶
صفحه ۵۷ الی ۶۷

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی ژن توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک، در نمونه‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به روش Multiplex PCR

محمد بکائیان[۱]، حامد طهماسبی[۲*]، شهرام شهرکی زاهدانی[۱]، جواد ادبی[۲]

[۱]مرکز بیماری‌های عفونی گرمسیری زاهدان، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

[۲]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
حامد طهماسبی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
h.tahmasebi87@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: توکسین‌های تولیدشده به‌وسیله باکتری‌ها، یکی از شایع‌ترین مواردی است که می‌تواند در کنار سایر عوامل بیماری‌زای باکتریایی، باعث بروز یا تشدید بیماری شود. ازجمله بیماری‌های ایجادشده توسط توکسین‌های باکتریایی می‌توان به سندرم شوک توکسیک اشاره کرد. عامل تولید این توکسین ژن *tst* بوده که می‌تواند بین سویه‌های مختلف *استافیلوکوک اورئوس* به‌راحتی منتقل شود. در این مطالعه ژن توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک در نمونه‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به روش Multiplex PCR بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، طی یک دوره ۹ ماهه، ۴۷۰ نمونه از بیماران بستری در بخش‌های مختلف و مراجعه‌کننده به مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. جداسازی و غربالگری اولیه سویه مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از روش فنوتیپی انجام گرفت. از دیسک‌های اوگزاسیلین و سفوکسیتین استفاده گردید. بعد از جداسازی سویه‌های مقاوم، ژن‌های *mecA*، *femA* با روش ژنوتیپی و ژن *tst* با روش مولتی‌پلکس PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: از ۱۷۰ ایزوله بالینی *استافیلوکوک اورئوس*، ۹۳ ایزوله از نظر فنوتیپی دارای مقاومت به متی‌سیلین بودند که از این میان، ۸۹ ایزوله دارای ژن *mecA* و ۱۴ ایزوله دارای ژن *tst* بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌هایی که توانایی حمل ژن عامل TSST1 را دارا هستند، در شهر زاهدان بالا بوده است. همچنین گردش این ایزوله‌ها در افرادی‌که سطح ایمنی ضعیفی دارند می‌تواند اثرات بسیار شدیدتری را از خود بر جای بگذارد.

کلید واژه‌ها: *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین؛ توکسین۱ سندرم شوک توکسیک؛ انتروتوکسین‌ها؛ مقاومت دارویی.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Bokaeian M, Tahmasebi H, Shahraki Zahedani Sh, Adabi J. An investigation of toxic shock syndrome Toxin-1 Gene in methicillin-resistant clinical strains of Staphylococcus aureus using multiplex PCR method. Qom Univ Med Sci J 2017;11(1):57-67. [Full Text in Persian]

مقدمه

توکسین‌ها، موادی هستند که توسط موجودات زنده ازجمله حیوانات، گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند (۱). توکسین‌های تولیدشده به‌وسیله باکتری‌ها، یکی از شایع‌ترین مواردی است که می‌تواند در کنار سایر عوامل بیماری‌زای باکتریایی، باعث بروز یا تشدید بیماری گردد (۲). ازجمله بیماری‌های ایجادشده توسط توکسین‌های باکتریایی می‌توان به سندرم شوک توکسیک (Toxic Shock Syndrome, TSS) اشاره کرد که به‌وسیله باکتری *استافیلوکوک اورئوس* ایجاد می‌شود و اولین‌بار توسط Todd و همکاران معرفی شد (۳).

این عارضه یک بیماری سیستمی است که تب، افت فشارخون، درد عضلانی، بثورات جلدی و در نهایت، پوسته‌ریزی از دست و پا را درپی داشته و به‌وسیله سمی به‌نام TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Syndrom-1) ایجاد می‌شود (۵،۴). TSST-1 پروتیئنی با وزن مولکولی تقریباً ۲۴۰۰ دالتون است و به‌طور معمول به‌وسیله سویه‌های بسیار زیادی از *استافیلوکوک اورئوس* تولید می‌شود (۶). همچنین می‌توان این توکسین را از افراد سالم نیز جدا کرد (۷).

این سم جزء سوپرآنتی‌ژن‌ها طبقه‌بندی شده و می‌تواند سیستم ایمنی را با تحریک آزادسازی سایتوکاین‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهد (۹،۸). عامل تولید این توکسین ژن *tst* بوده که می‌تواند بین سویه‌های مختلف *استافیلوکوک اورئوس* به‌راحتی منتقل شود (۱۰). از مهم‌ترین سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* می‌توان به *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) یا MRSA اشاره کرد (۱۱).

MRSA، یکی از رایج‌ترین سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* در ایجاد عفونت بیمارستانی است که پیوسته پزشکان را با مشکلاتی در زمینه درمان مواجه می‌کند (۱۲). اولین مورد MRSA در سال ۱۹۵۰ گزارش شد و از سال ۱۹۸۰ در بیمارستان‌ها اندمیک گردید (۱۳). شیوع بالای این سویه در نمونه‌های بالینی باعث اهمیت روزافزون این باکتری در سالهای اخیر شده است (۱۴). در یک بررسی انجام‌شده توسط Taylor در آمریکا (سال ۲۰۰۶)، مشخص گردید این باکتری سهم بسیار بالایی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دارد (۱۵). فراوانی سویه‌های MRSA در کشورهای آسیایی نظیر چین، کره و تایوان بیش از ۷۰٪، در آمریکای شمالی بیش از ۵۰٪، در اروپا۲۰٪ و در ایران حدود ۵۰٪ می‌باشد (۱۶). MRSA علاوه بر ایزوله‌های مربوط به انسان، از ایزوله‌های مربوط به مرغداری‌ها نیز جدا شده است (۱۷). همچنین MRSA علاوه بر بیمارستان، در جامعه نیز قابل‌ردیابی است که این مورد، خطر گسترش سویه را بیش از پیش افزایش می‌دهد (۱۸). به‌طورکلی MRSA در بیمارستان‌های همه کشورها بجز اسکاندیناوی و هلند اندمیک بوده که همین امر مطالعه بر روی این سویه را به یک موضوع مهم جهانی تبدیل کرده است (۱۹).

مکانیسم اصلی مقاومت به متی‌سیلین در *استافیلوکوک اورئوس* مربوط به تولید پروتئینی به‌نام PBP2 می‌باشد که میل ترکیبی کمی با بتالاکتام‌ها داشته و سبب مقاومت به بتالاکتام‌ها می‌شود (۲۰). PBP4 و PBP2A انواع دیگری از PBP هستند که به دلیل اهمیت PBP2 در ایجاد مقاومت به متی‌سیلین، به این پروتئین بیشتر پرداخته شده است (۲۱). تولید این پروتئین با ژن‌های *mec* موجود بر روی کروموزوم باکتری مرتبط است (۲۲). حضور ژن *mecA* منجر به بروز استافیلوکوک اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین می‌شود (۲۳). ژن *mecA* بر روی یک المنت ژنتیکی سیار قرار دارد که به آن کاست کروموزومی *mec* استافیلوکوکی (Staphylococcus Casset Cromosom mec) می‌گویند (۲۴). از آنجایی‌که بخش عمده‌ای از کارکنان شاغل در بیمارستان حامل این باکتری در پوست خود هستند، لذا می‌توانند آن را به‌راحتی به سایرین منتقل کرده و سبب گردش سویه‌های خطرساز مولد TSST-1 شوند (۲۵). ازطرفی، انتقال افقی ژن *tst* به‌واسطه عناصر متحرک ژنتیکی در کنار گردش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* می‌تواند باعث بروز مشکلاتی زیادی در سیر درمان و افزایش بیماری‌زایی شود (۲۶). با توجه به شیوع روزافزون عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *استافیلوکوک اورئوس* و مقاومت بیش از پیش باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و انتقال ژن‌های عامل مقاومت بین سویه‌ها، همچنین گسترش ژن‌های کدکننده توکسین TSST-1، در این مطالعه به بررسی وجود ژن‌های *tst* و *mecA* در جدایه‌های به‌دست‌آمده از بیمارستان‌های شهر زاهدان پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، طی یک دوره ۹ ماهه، ۴۷۰ نمونه از بیماران بستری در بخش‌های مختلف، از بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌های جمع‌آوری‌شده داخل میکروتیوب‌های پلاستیکی درب‌دار {حاوی محیط ترانسپورت BHI (شرکت Merck آلمان) با ۱۰٪ گلیسرول} تلقیح و برای انجام آزمایشهای تکمیلی و تشخیصی دقیق‌تر به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شدند. تا زمان انجام آزمایشها، نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه‌های به‌دست‌آمده بر روی محیط بلاد آگار (شرکت Merck آلمان) پایه که با ۵٪ خون تازه گوسفندی غنی شده بود، به‌صورت خطی کشت داده شده و به‌مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از مشاهده کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم، انجام و کوکسی‌های گرم مثبت جداسازی شدند. برای تفریق استافیلوکوک‌ها از استرپتوکوک‌ها، از تست کاتالاز و برای تشخیص استافیلوکوک‌ها از میکروکوک‌ها از آزمایش اکسیداسیون و احیا OF (Oxidation and Fermentation Test) استفاده گردید. برای تفکیک استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت از استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی، از تست کوآگولاز لوله‌ای استفاده شد. در نهایت، ۱۷۰ ایزوله *استافیلوکوک اورئوس* بعد از انجام آزمایشهای افتراقی از مجموع ۴۷۰ نمونه جمع‌آوری‌شده به دست آمد (۲۷). بعد از تهیه محلول ۰/۵ مک‌فارلند و کشت بر روی محیط مولر هیلتون آگار (شرکت Merck آلمان)؛ دیسک سفوکسیتین ۳۰میکروگرم و اوگزاسیلین ۱ میکروگرم (هر دو mast انگلستان) را با ضخامت ۵ میلی‌متر، با یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. براساس جدیدترین معیار CLSI، درصورتی‌که قطر هاله ایجادشده نسبت به دیسک سفوکسیتین بیشتر از ۲۱ میلی‌متر باشد به‌عنوان *استافیلوکوک اورئوس* حساس به سفوکسیتین در نظر گرفته شده و درصورتی‌که قطر هاله نسبت به دیسک سفوکسیتین کمتر از ۲۱ میلی‌متر باشد، ایزوله *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به سفوکسیتین و قطر هاله ایجادشده نسبت به دیسک اوگزاسیلین بیشتر از ۲۱ میلی‌متر نیز به‌عنوان *استافیلوکوک اورئوس* حساس به اوگزاسیلین در نظر گرفته می‌شود (۲۷). در این مطالعه، از سویه *استافیلوکوک اورئوس* ATCC33591 به‌عنوان سویه استاندارد کنترل مثبت و از سویه استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ATCC25923 برای کنترل منفی استفاده گردید (۲۸). تعیین حساسیت ایزوله‌های بالینی به هفت آنتی‌بیوتیک بتالاکتام شامل: پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین، اوگزاسیلین (۱ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم، سفازولین (۳۰ میکروگرم) و سفالکسین (۳۰ میکروگرم) (همگی ساخت شرکت Mast انگلستان) با استفاده از روش Kirby-Bauer Disk Diffusion انجام شد. در این روش، برای به‌حداقل رساندن آلودگی، دیسک‌ها با فواصل مناسب به‌وسیله دستگاه Disc Dispenser (ساخت شرکت Mast انگلستان) روی سطح پلیت قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از آخرین نسخه CLSI مورد بررسی قرار گرفت.

برای انجام استخراج DNA ژنومیک، مراحل اولیه به‌صورت زیر انجام شد:

ابتدا ایزوله‌های بالینی تأییدشده با آزمایشهای بیوشیمیایی ذخیره‌شده در ۲۰- درجه سانتیگراد روی محیط بلاد آگار پایه (شرکت Merck آلمان) با ۵٪ خون گوسفند، ساب کالچر داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس یک کلنی از هر ایزوله کشت داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (شرکت Merck آلمان) که درون لوله‌های درب‌دار شیشه‌ای به تعداد ایزوله‌ها، تقسیم و شماری‌گذاری شده بود، تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ساعت انکوبه گردید. ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب‌های درب‌دار ۱/۵ پلاستیکی ریخته شد و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سیناژن (Cat. No.PR881614) براساس پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. DNA به‌دست‌آمده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد برای انجام آزمون‌های مولکولی، ذخیره شد.

برای شناسایی ژن‌های *mecA*، *femA* و *tst* از پرایمرهای زیر استفاده گردید:

جدول شماره ۱: لیست پرایمرهای مورد استفاده به همراه مشخصات آنها

مرجع	ژن‌های مورد نظر	توالی پرایمرهای مورد استفاده	طول ژن (bp)
Manisha Mehrotra و همکاران(۲۹)	*femA*	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	۱۳۲
Manisha Mehrotra و همکاران(۱۶)	*mecA*	ACTGCTATCCACCCTCAAAC CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	۱۶۳
Manisha Mehrotra و همکاران(۱۶)	*tst*	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GATTGG	۳۲۶

جهت انجام واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر از محلول نهایی شامل: ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۲۵ میکرولیتر از مستر میکس (شرکت Ampliqon آلمان) که شامل موارد زیر بود استفاده شد.

- Tris-Hcl PH8.5, (NH_4) SO_4, 3mMMgcl$_2$,0.2%Tween20
- 0.4MmdNTP
- 0.2 unit Ampliqon polymeras
- Insert red dye and stabilizer

برای رساندن به حجم نهایی، از آب مقطر دیونیزه استفاده گردید. مخلوط PCR فاقد DNA الگو نیز به‌عنوان کنترل منفی به کار برده شد (۱۴)، سپس آزمون PCR برای ژن *mecA* با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا)، براساس پروتکل دمایی زیر انجام گرفت:

جدول شماره ۲: سیکل دمایی انجام واکنش Multiplex PCR برای ژن‌های مورد نظر

مراحل	دما	زمان	تعداد سیکل
شوک حرارتی اولیه	۹۴	۵دقیقه	۱
جداشدن قطعات DNA	۹۴ درجه سانتیگراد	۲دقیقه	
جفت‌شدن پرایمرها	۵۷ درجه سانتیگراد	۲ دقیقه	۳۵
طویل‌شدن پرایمرها	۷۲ درجه سانتیگراد	۱ دقیقه	
طویل‌شدن نهایی	۷۲ درجه سانتیگراد	۷دقیقه	۱

۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۳٪ در بافر ۰/۵X الکتروفورز گردید. برای مشاهده دقیق باندها به‌صورت Multiplex، از ژل با درصد غلظت بالا استفاده شد. هنگام تهیه ژل، به آن ۵ میکرولیتر محلول Gel Red (ساخت Biotium آمریکا) اضافه گردید. نتیجه نهایی به‌وسیله دستگاه CCD (Gel Documentation system، مدل CCD-Tab1 ساخت کیاژن ایران)، بررسی و از آن عکس تهیه شد. سپس از مارکر ۱۰۰bp فرمنتاز (شرکت Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده گردید. آزمون PCR به‌عنوان گلد استاندارد برای مقایسه با سایر نتایج به کار برده شد.

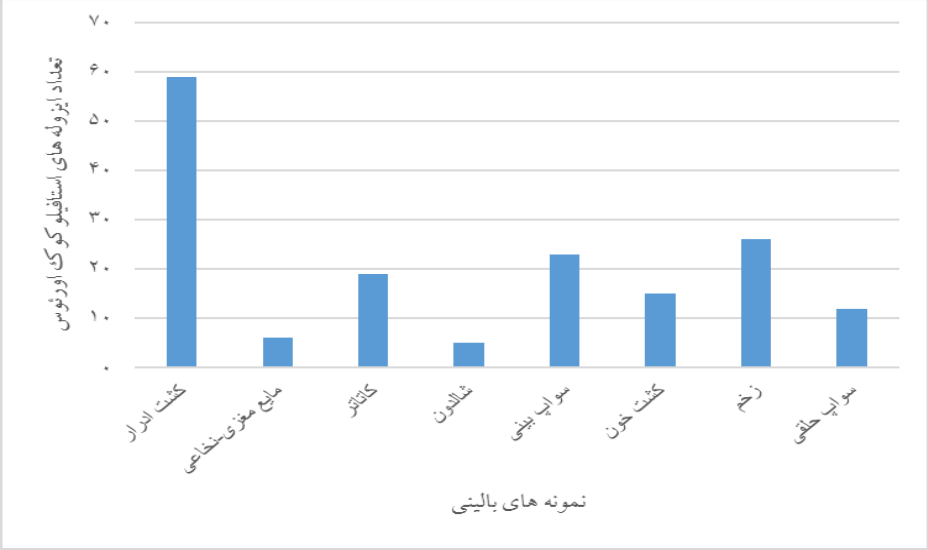
یافته‌ها

در این مطالعه، بیشترین سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مربوط به نمونه‌های گرفته‌شده از مردان بود و زنان دارای بیشترین سویه‌های حساس به متی‌سیلین بودند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: فراوانی حساسیت نمونه‌های به‌دست‌آمده براساس جنسیت بیماران

جنسیت	نوع باکتری n=۱۷۰	
	استافیلوکوک اورئوس حساس به متی‌سیلین	استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
جنس بیمار	n=۷۷	n=۹۳
مرد	۲۹(۳۷/۶۶٪)	۵۲ (۵۵/۹۱٪)
زن	۴۸(۶۲/۳۳٪)	۴۱ (۴۳/۰۸)

نمونه‌های به‌دست‌آمده از کشت ادرار (۳۴٪)، زخم (۱۵/۲۹٪) و سواپ بینی (۱۳/۵۲٪)، بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند. کمترین مقدار نیز مربوط به مایع مغزی نخاعی بود که ۳/۵٪ و شالدون ۲/۹٪ کل نمونه‌ها را به خود اختصاص دادند (نمودار).



نمودار: فراوانی سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های مختلف

همچنین کمترین و بیشترین مقاومت به ترتیب مربوط به پنی‌سیلین و ونکومایسین بود. اوگزاسیلین و سفوکسیتین نیز بعد از پنی‌سیلین از فراوان‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های فاقد حساسیت بودند (جدول شماره ۴). جهت بالابردن دقت در تشخیص باکتری *استافیلوکوک اورئوس* از ژن *femA* با طول ۱۳۲bp استفاده شد. همه ایزوله‌های استافیلوکوک که از نظر تست بیوشیمیایی مورد سنجش اولیه قرار گرفته و اورئوس بودن آنها تأیید شده بود، دارای ژن *femA* بودند. در این بین از ۱۷۰ ایزوله تعیین هویت‌شده به‌عنوان *استافیلوکوک اورئوس*؛ ۹۳ ایزوله از نظر فنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین، ۸۹ ایزوله دارای ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین و ۴ ایزوله که از نظر فنوتیپی مثبت بودند *mecA* نداشتند.

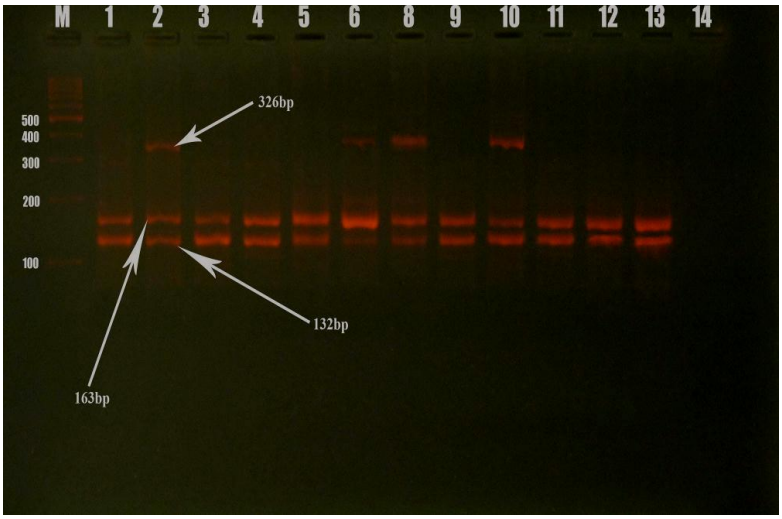
همچنین از ۹۳ ایزوله مقاوم به متی‌سیلین از نظر فنوتیپی؛ ۱۲مورد دارای ژن عامل توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک و ۲ ایزوله از نمونه‌های حساس به متی‌سیلین دارای ژن *tst* بودند (جدول شماره ۵). ژن *tst* که یک ژن ۳۲۶bp می‌باشد در شکل نشان داده شده است. با توجه به یافته‌ها، حدود ۵۲/۳۵٪ از نمونه‌هایی که از نظر فنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین بودند، دارای ژن *mecA* و از این ۸۹ سویه مقاوم به متی‌سیلین، ۱۳/۴۳٪ دارای ژن *tst* بودند (شکل). همچنین سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* (حامل ژن *mecA*)، دارای بیشترین فراوانی از نظر حضور ژن عامل توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک *tst* بودند (جدول شماره ۵).

جدول شماره ٤: درصد فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در نمونه‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس*

آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت				
	غلظت دیسک	حساس (٪)	نیمه‌حساس (٪)	مقاوم (٪)	تعداد کل
سفوکسیتین	۳۰ میکروگرم	۷۷ (٪۴۵/۳)	۰	۹۳ (٪۵۴/۷)	۱۷۰
ونکومایسین	۳۰ میکروگرم	۱۷۰ (٪۱۰۰)	۰	۰	۱۷۰
اوگزاسیلین	۱ میکروگرم	۶۹ (٪۴۰/۵۸)	۰	۱۰۱ (٪۵۹/۴۱)	۱۷۰
سفازولین	۳۰ میکروگرم	۱۴۰ (٪۷۴/۷۸)	۰	۳۰ (٪۲۵/۲)	۱۷۰
اریترومایسین	۱۵ میکروگرم	۴۵ (٪۲۶/۵)	۱۰ (٪۵/۹)	۱۱۵ (٪۶۷/۶۴)	۱۷۰
پنی‌سیلین جی	۱۰ واحد	۰	۰	۱۷۰ (٪۱۰۰)	۱۷۰

جدول شماره ٥: درصد فراوانی ژن‌های عامل مقاومت به متی‌سیلین و توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک در نمونه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (فنوتیپی)

ژن	*استافیلوکوک اورئوس* (n=۱۷۰)	
	استافیلوکوک اورئوس حساس به متی‌سیلین(فنوتیپی) (n=۷۷)	استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین(فنوتیپی) (n=۹۳)
mecA	۰	۸۹
Tst	۲	۱۲



شکل: نتیجه تکثیر ژن‌های *femA*، *mecA* و *tst* مربوط به عامل مقاومت به متی‌سیلین و عامل توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک.
چاهک شماره‌های ۱۲-۱ مربوط به نمونه‌های حاوی ژن‌های *femA*، *mecA* و *tst*، که به ترتیب داری وزن مولکولی ۱۳۲، ۱۶۳ و ۳۲۶ هستند.
چاهک شماره ١٤ کنترل منفی می‌باشد. چاهک شماره ۱۳ کنترل مثبت. M هم مارکر ۱۰۰bp می‌باشد.

بحث

MRSA، یکی از رایج‌ترین سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* در ایجاد عفونت بیمارستانی است که پیوسته پزشکان را با مشکلاتی در زمینه درمان مواجه می‌کند (۶). شیوع بالای این سویه در نمونه‌های بالینی باعث اهمیت روزافزون این باکتری در سالهای اخیر شده است (۸). در یک بررسی انجام‌شده در آمریکا (سال ۲۰۰۶)، مشخص گردید این باکتری سهم بسیار بالایی در ایجاد عفونت‌های ناشی از بستری افراد در بیمارستان دارد که با فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های به‌دست‌آمده همخوانی داشت (۹). این درحالی است که بیشتر این سویه‌های مقاوم دارای قدرت بیشتری از نظر تولید توکسین،تهاجم و نفوذ به بافت‌های مختلف را دارند (۹). Mehrotra و همکاران با مطالعه همزمان *mecA* و *tst* (به‌ترتیب عامل مقاومت به متی‌سیلین و تولید توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک) در *استافیلوکوک اورئوس* به بررسی ارتباط

فراوانی این دو ژن پرداختند که در نتیجه نشان دادند حدود ۲۴٪ از سویه‌های MRSA توانایی حمل ژن تولیدکننده TSST-1 را دارا هستند (۲۹). سویه‌های تولیدکننده توکسین‌های سوپر آنتی‌ژن، به‌خصوص سویه‌هایی که توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک را تولید می‌کنند، علاوه بر اینکه می‌توانند در بروز مقاومت‌های دارویی، نقش مهمی را ایفا کنند، قادر به تولید توکسین با شدت بیشتر و درنهایت، قدرت آسیب‌رسانی بیشتری را درپی خواهند داشت. از طرف دیگر، با مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک در دهه‌های اخیر، ظهور سویه‌های مقاوم و خطرساز سرعت بیشتری به خود گرفته است (۳۰،۳۱). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد سویه‌های MRSA از نظر آنتی‌بیوتیکی نسبت به سویه‌های حساس به متی‌سیلین دارای تعدد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف هستند. در ایران، شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین پیوسته در حال افزایش است، به‌طوری‌که نوربخش و همکاران (سال ۱۳۹۱)، مطالعه‌ای را در اصفهان بر روی نمونه‌های تورم گوش، گرفته‌شده از بیمارستان رسول‌اکرم اصفهان انجام دادند که تنها ۳۹٪ از ایزوله‌ها فاقد ژن عامل TSST-1 بودند، این یافته با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر مغایرت داشت (۳۲). همچنین جوادی‌نیا و همکاران (سال ۱۳۹۳) با مطالعه بر روی نمونه‌های گرفته‌شده از بیمارستان آموزشی شهید مطهری تهران از بخش سوختگی، وجود و عدم وجود توکسین را در بیماران سوختگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج مثبت آزمون PCR (تولید سم نوع یک سندرم شوک سمی) در کودکان تب‌دار، ۳۷/۷٪ و در کودکان فاقد تب، ۱۱/۱٪ بود. این امر علاوه بر اینکه نزدیکی کمی را با مطالعه حاضر نشان می‌دهد، بیان‌کننده حضور این توکسین در بروز تب نیز می‌باشد (۳۳). نوربخش و همکاران (سال ۱۳۹۱) در یک مطالعه مقطعی - تحلیلی در بخش‌های عفونی و ارتوپدی بیمارستان رسول اکرم (ص) نشان دادند در بیشتر موارد، ژن عامل توکسین گزارش نمی‌شود (۳۳). در مطالعات عربستانی و همکاران در همدان (سال ۲۰۱۴) نیز حدود ۱۱٪ از موارد بررسی‌شده حاوی ژن *tst* بودند که همگی به متی‌سیلین مقاومت نشان دادند، این میزان از نتیجه به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر بیشتر بود (۳۴).

در مطالعه صابونی و همکاران در تهران (سال ۱۳۹۳)، ۱۲٪ از جدایه‌های MRSA حاوی ژن *tst* بودند (۳۵)، که نتایج این مطالعه نزدیک به یافته‌های مطالعه حاضر بود. در مطالعه‌ای‌که گودرزی گویا و همکاران در قم (سال ۱۳۹۱) انجام دادند طی ۵ ماه، از ۱۵۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۸۰ سویه به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند. در این بررسی از روش PCR جهت شناسایی ژن‌های انتروتوکسین A-E و TSST-1 استفاده شده بود که از ۸۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده، ۵۳ سویه (۶۶/۲۵٪) حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین، TSST-1 و در میان نمونه‌های مثبت، ۱۴ سویه (۲۶/۴۱٪) دارای ژن *tst* بودند (۳۶). مطالعات جوادی‌نیا و همکاران (سال ۱۳۹۳) نیز که در شهر تهران انجام شد، نشان داد وجود بیش از ۷٪ از نمونه‌های *استافیلوکوک اورئوس* همراه با ژن *tst* بوده است (۳۳). در مطالعه انجام‌شده توسط نوربخش و همکاران (سال ۱۳۹۴) در اصفهان، بیش از ۹۰٪ از نمونه‌های به‌دست‌آمده از نوع مقاوم به متی‌سیلین و حاوی ژن *mecA* بود (۳۷). همچنین در بررسی انجام‌شده توسط گماریان و همکاران (سال ۱۳۹۴)، بیش از ۶۰٪ از نمونه‌های به‌دست‌آمده حاوی ژن *mecA* گزارش شد (۳۸). در مطالعات خارجی می‌توان شیوع بالای استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین، همچنین شیوع روزافزون سویه‌های تولیدکننده سندرم ۱ شوک توکسیک را مشاهده کرد. در مطالعه Tsen و همکاران که به بررسی ژن‌های عامل بیماری‌زا در سویه MRSA پرداخته بودند، مشخص گردید حدود ۸٪ از سویه‌ها دارای ژن *tst* هستند (۳۹). در مطالعه Sauer و همکاران در بررسی ارتباط بین مقاومت به متی‌سیلین و فاکتورهای بیماری‌زای خارج‌سلولی، حدود ۶٪ از سویه‌های MRSA دارای ژن *tst* بودند (۳۰). Tristan و همکاران نیز در مطالعه خود با بررسی وجود ژن *tst* در نمونه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جمع‌آوری‌شده از بیمارستان و جامعه نشان دادند احتمال حمل ژن *tst* توسط سویه‌های MRSA وجود دارد (۲۶). در یک مطالعه مروری دیگر توسط DeVries و همکاران به بررسی اپیدمیولوژی و شناسایی مولکولی ژن *tst* در سویه‌های MRSA پرداخته شد (۴۰). در بیشتر موارد، گزارشهای به‌دست‌آمده از این مطالعات، از مقادیر به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر بیشتر است که نشان می‌دهد در مناطق مختلف، گسترش

مقاومت و سویه‌های خطرساز از نرخ یکسانی برخوردار نیست و رشد این سویه‌ها در برخی گزارشها نیز به چشم می‌خورد. از این‌رو باید با جمله‌بندی‌های بیشتر و مطالعات مقطعی متعدد، میزان شیوع این موارد را بررسی و با آگاهی بیشتر با آنها مقابله کرد.

نتیجه‌گیری

شیوع سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و حامل ژن‌های تولیدکننده توکسین، به یک امر جدی و خطرناک تبدیل شده است. این سویه‌ها در کنار مقاومتی که پیدا کرده‌اند، قدرت تهاجمی بیشتری نسبت به سویه‌های فاقد توکسین دارند که علاوه بر مقاومت در مقابل درمان، بیمار را با شدت بیشتری آزار می‌دهد. وجود سویه‌های دارای همولوگ‌های ژنتیکی که در برخی موارد توسط روش‌های فنوتیپی قابل‌تشخیص نیستند، همچنین گردش این سویه‌ها بین افراد حامل و انتقال آنها به افراد دارای ایمنی نامناسب، طبعات شدیدی را درپی خواهد داشت. از این‌رو باید در کنار کنترل مصرف داروها، با شناسایی به‌موقع و ارائه راهکارهای مناسب، از گسترش این سویه‌های خطرناک جلوگیری کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارشناسان محترم دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، کارشناسان محترم بیمارستان علی‌ابن‌ابیطالب (ع) و مسئولین محترم مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی گرمسیری که در ارائه این مقاله ما را یاری کردند کمال تشکر را داریم.

References:

1. Ranjbar R. A review of different methods used for detection of toxins. J Mil Med 2008;10(1):1-10. [Full Text in Persian]

2. Humphreys H. Role of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in systemic staphylococcus aureus infection. Infect Dis Newsl 1993;12(3):17-20.

3. Quan L, Morita R, Kawakami S. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) antibody levels in Japanese children. Burns 2010;36(5):716-21.

4. Goyache J, Ruiz-Santa Quiteria JA, Orden JA, Hernandez FJ, Gomez-Lucia E, de la Fuente R, et al. TSST-1 production by Staphylococcus aureus subsp. Anaerobius. Res Microbiol 1990;141(9):1073-6.

5. Burd A. Toxic shock syndrome in paediatric burns: A peculiarly British malady or a malady of peculiar British? Burns 2005;31(7):937-8.

6. Deurenberg RH, Nieuwenhuis RF, Driessen C, London N, Stassen FR, van Tiel FH, et al. The prevalence of the Staphylococcus aureus tst gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. FEMS Microbiol Lett 2005;245(1):185-9.

7. Aslanimehr M, Tavakoli M, Peymani A, Javadi A. Frequency of tst, entB and entC genes in clinical isolates of staphylococcus aureus isolated from teaching hospitals in Qazvin, Iran. Res Med 2013;37(1):62-6. [Full Text in Persian]

8. Macias ES, Pereira FA, Rietkerk W, Safai B. Superantigens in dermatology. J Am Acad Dermatol 2011;64(3):455-72.

9. Chung JW, Karau MJ, Greenwood-Quaintance KE, Ballard AD, Tilahun A, Khaleghi SR, et al. Superantigen profiling of Staphylococcus aureus infective endocarditis isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2014;79(2):119-24.

10. Dumitrescu O, Dauwalder O, Gillet Y, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, et al. Les infections communautaires à Staphylococcus aureus en pédiatrie: Émergence des staphylocoques dorés résistants à la méticilline d'origine communautaire. Rev Francophone des Lab 2008;2008(407):71-80.

11. Lozano C, Porres-Osante N, Crettaz J, Rojo-Bezares B, Benito D, Olarte I, et al. Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a Spanish hospital. J Infect Chem 2013;19(2):233-42.

12. Tenover FC. VRSA, VISA and GISA: The dilemma behind the name game. J Clin Microbiol 2000;22(7):49-53.

13. Quirk M. First VRSA isolate identified in USA. Lancet Infect Dis 2002;2(9):510.

14. 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.

15. Taylor AR. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Prim Care 2013;40(3):637-54.

16. 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 Health Serv 2013;35(2):40-5. [Full Text in Persian]

17. Musharrafieh R, Tacchi L, Trujeque J, LaPatra S, Salinas I. Staphylococcus warneri, a resident skin commensal of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) with pathobiont characteristics. Vet Microbiol 2014;169(1-2):80-8.

18. Sfeir M, Obeid Y, Eid C, Saliby M, Farra A, Farhat H, et al. Prevalence of Staphylococcus aureus methicillin-sensitive and methicillin-resistant nasal and pharyngeal colonization in outpatients in Lebanon. Am J Infect Control 2014;42(2):160-3.

19. Khalili MB, Moshref M, Sharifi M, Sadeh M, Sazmand A. Prevalence of Staphylococcus aureus (SA) and methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) In personnel of operation room of shahid sadoughi hospital, Yazd, Iran. J Payavard Salamat 2013;6(5):392-402. [Full Text in Persian]

20. Ouchenane Z, Smati F, Rolain JM, Raoult D. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in Algeria. Pathol Biol (Paris) 2011;59(6):e129-32.

21. Leski TA, Tomasz A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of Staphylococcus aureus: Evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. J Bacteriol 2005;187(5):1815-24.

22. Chovanova R, Mikulasova M, Vaverkova S. Modulation of meca gene expression by essential oil from salvia sclarea and synergism with oxacillin in methicillin resistant Staphylococcus epidermidis carrying different types of staphylococcal chromosomal cassette mec. Int J Microbiol 2016;2016:6475837.

23. Levitt GA. Infection control for MRSA in a psychiatric hospital. Gen Hosp Psychiatry 2014;36(4):422-4.

24. Abdollahi A, Koohpayeh SA, Najafipoor S, Mansoori Y, Abdollahi S, Jaafari S. Evaluation of drug resistance and staphylococcal cassette chromosome (sccmec) types among methicillin-resistant staphylococcus aureus(MRSA). Alborz Univ Med J 2012;1(1):47-52. [Full Text in Persian]

25. Shimizu T, Yamamoto Y, Hosoi T, Kinoshita K, Tokuda Y. MRSA toxic shock syndrome associated with surgery for left leg fracture and co-morbid compartment syndrome. J Acute Dis 2014;3(1):82-4.

26. Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, et al. Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant staphylococcus aureus. J Hosp Infect 2007;65 Suppl 2:105-9.

27. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9th ed. M07-A9 2012 32(2).

28. Rezaei M, Moniri R, Piroozmand A, Mousavi G. Diagnostic value of cefoxitin susceptibility test compared with other diagnostic methods of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Feyz 2013;17(4):394-9. [Full Text in Persian]

29. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus Enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol 2000;38(3):1032-5.

30. Sauer P, Sila J, Stosova T, Vecerova R, Hejnar P, Vagnerova I, et al. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. J Med Microbiol 2008;57(Pt 4):403-10.

31. 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.

32. Noorbakhsh S, Farhadi M, Tabatabaei A. Staphylococcal superantigens; toxic shock syndrome toxin-1 and enterotoxins in pediatric otitis media effusion: A brief report. Tehran Univ Med J 2013, 70(12): 793-7. [Full Text in Persian]

33. Javadinia S, Asgarian R, Noorbaksh S, Soboti B, Shokrollahi MR, Tabatabaee A. Toxic shock syndrome toxin level in wound samples of hospitalized children with burn: A case control study. Tehran Univ Med J 2014, 72(2):113-20. [Full Text in Persian]

34. 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. [Full Text in Persian]

35. Sabouni F, Mahmoudi S, Bahador A, Pourakbari B, Sadeghi RH, Ashtiani MTH, et al. Virulence factors of Staphylococcus aureus isolates in an iranian referral children's hospital. Osong Public Health Res Perspect 2014;5(2):96-100.

36. Nowroozi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. 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. [Full Text in Persian]

37. Nourbakhsh F, Momtaz H. Detection of antibiotic resistance patterns in Staphylococcus aureus strains isolated from patients admitted to Isfahan hospitals during 2014-2015. Feyz 2015;19(4):356-63.

38. Gomarian Z, Shahhosseiny M, Bayat M, Mahmoudi M, Nafarieh T, Rahbar M. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from moheb hospital and miladphenotypic and molecular methods. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015;23(4):2096-108. [Full Text in Persian]

39. Tsen HY, Yu GK, Wang KC, Wang SJ, Chang MY, Lin LY. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin I (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenicStaphylococcus aureusstrains isolated from food and clinical samples. Food Microbiol 1998;15(1):33-41.

40. DeVries AS, Lesher L, Schlievert PM, Rogers T, Villaume LG, Danila R, et al. Staphylococcal toxic shock syndrome 2000–2006: Epidemiology, clinical features, and molecular characteristics. PLoS ONE 2011;6(8):229-97.