

Determination of hemolysine genes frequency in antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from wound and urine samples of patients

Mina Aghsafi¹, Zahra Tahmasebi Fard²

¹ MSc of Microbial Biotechnology, Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

² Associated Professor of Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* is a pathogenic bacterium that can target host cell membranes with virulence factors such as toxins and peptides. This study was evaluated the frequency of *alpha*, *beta*, and *delta* hemolysine genes in antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients' urine and wound samples.

Materials and methods: This cross-sectional study was performed on 100 antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* (tetracycline, penicillin, gentamicin, co-trimoxazole, tobramycin, and ciprofloxacin) isolated from wound and urine samples of patients who referred to medical diagnostic laboratories. Then, their antibiotic susceptibility was determined by the disk diffusion method based on CLSI instruction. After examining the MIC and MBC of the samples, a single colony culture was performed for the samples and their DNA was extracted by using a commercial kit. By designing specific primers, hemolysine *alpha*, *beta*, and *delta* genes were amplified in the samples. The results were analyzed by statistical software.

Results: In isolated *Staphylococcus aureus*, the highest antibiotic resistance was related to co-trimoxazole with 63% and the highest sensitivity to penicillin with 53%. There was a statistically significant relationship between resistance to tetracycline and co-trimoxazole antibiotics and age, and also ciprofloxacin showed greater resistance in women than men. The frequency of hemolysine genes was 91% for *HLA*, 96% for *HLB*, and 99% for *HLD*.

Conclusion: Penicillin antibiotic with 53% sensitivity seems to be a better candidate than other antibiotics and the high abundance of hemolysine genes should be considered as an important concern in the medical community.

Keywords: *Alpha hemolysine*, *Beta hemolysine*, *Delta hemolysine*, *Staphylococcus aureus*.

Cited as: Aghsafi M, Tahmasebi Fard Z. Determination of hemolysine genes frequency in antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from wound and urine samples of patients. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 31(4): 406-412.

Correspondence to: Zahra Tahmasebi Fard

Tel: +98 9122266686

E-mail: ztahmasebi@riau.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-9104-6308

Received: 10 Aug 2021; **Accepted:** 15 Sep 2021

تعیین فراوانی ژن‌های همولیزین آلفا، بتا و دلتا در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جدا شده از نمونه‌های زخم و ادرار بیماران

مینا آقاصفی^۱، زهرا طهماسبی فرد^۲

کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
دانشیار زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری‌های پاتوژن است که با فاکتورهای ویروالانس نظیر توکسین‌ها و پپتیدها می‌تواند غشاء سلول‌های میزبان را هدف قرار دهد. در این تحقیق میزان فراوانی ژن‌های همولیزین آلفا، بتا و دلتا در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های جدا شده از نمونه‌های ادرار و زخم بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک (تتراسایکلین، پنی‌سیلین، جنتامایسین، کوتریموکسازول، توبرامایسین و سیپروفلوکساسین) از نمونه‌های زخم و ادرار بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به کمک تست‌های تشخیصی جداسازی شد. سپس حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها به روش دیسک دیفیوژن بر اساس جدول CLSI تعیین شد. بعد از بررسی MIC و MBC نمونه‌ها، کشت تک کلنی برای نمونه‌ها انجام گرفت و با استفاده از کیت تجاری، DNA آنها استخراج شد. با طراحی پرایمرهای اختصاصی، ژن‌های همولیزین آلفا، بتا و دلتا در نمونه‌ها تکثیر شدند و نتایج حاصله با آزمون‌های آماری تحلیل شد.

یافته‌ها: در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین مقاومت در برابر کوتریموکسازول با ۶۳٪ و بیشترین حساسیت به پنی‌سیلین با ۵۳٪ دیده شد. بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و کوتریموکسازول و سن رابطه آماری معنی‌داری دیده شد و همچنین سیپروفلوکساسین در زنان مقاومت بیشتری نسبت به مردان نشان داد. فراوانی ژن‌های همولیزین در hla ۹۱٪، hnb ۹۶٪ و hld ۹۹٪ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین با ۵۳٪ حساسیت، کاندید بهتری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌هاست و فراوانی زیاد ژن‌های همولیزین باید به عنوان یک نگرانی مهم در جامعه پزشکی در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: آلفاهمولیزین، بتاهمولیزین، دلتا همولیزین، استافیلوکوکوس اورئوس.

مقدمه

(کنترل شود. از دلایل مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان عناصر متحرک ژنتیکی از جمله پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و کاست کروموزومی استافیلوکوکی یا جهش در ژن‌های کروموزومی را در نظر گرفت. باکتری‌ها با فعال کردن مکانیسم‌هایی از جمله غیرفعال سازی دارو، تغییرات آنزیمی در محل اتصال دارو، پس زدن دارو و جابجایی دارو برای محافظت از هدف آن، عمل می‌کنند. کاملاً واضح است که استافیلوکوکوس اورئوس به همراه سایر باکتری‌ها توانایی فوق العاده‌ای در ایجاد مقاومت در برابر هر آنتی‌بیوتیکی را دارند (۱).

اهداف اصلی آنتی‌بیوتیک‌ها برای اثرگذاری بر روی استافیلوکوک‌ها عبارتند از غشاء سلول، ریبوزوم و اسیدهای نوکلئیک. در اهداف درمانی جدید تلاش می‌شود تا با پروتئازهای خاصی، ماشین تقسیم سلولی (مثل FtsZ & ClpP

آدرس نویسنده مسئول: رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، گروه زیست‌شناسی، زهرا طهماسبی فرد (email: ztahmasebi@riau.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0002-9104-6308
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۱۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۴

فراوانی ژنهای همولیزین الف، بتا و دلتا در جدایه‌ها به کمک تکنیک‌های کشت، تست‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR) بود.

مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی، از مجموع ۲۴۰ بیمار مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های شهر تهران (در طی شش ماه از اردیبهشت تا مهر ماه سال ۱۳۹۷)، بعد از کسب اجازه به منظور رعایت اصول اخلاقی و امانت و صداقت در پژوهش، نمونه‌گیری شد (IR.IAU.PS.REC.1397.024) تا از نمونه‌های اخذ شده، تعداد ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شود.

نمونه گیری و انجام تست های تشخیصی

ابتدا ۲۴۰ نمونه گرفته شده برای غنی سازی در محیط کشت بلاد آگار (شرکت مرک، آلمان) کشت داده شدند و جهت خالص سازی باکتری، از محیط کشت کروم آگار (شرکت مرک، آلمان) اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. با توجه به اینکه برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس در کروم آگار قادر به ایجاد کلنی‌های آبی، سفید یا بی‌رنگ هستند، پس از طی دوره انکوباسیون، کلنی‌های تک و خالص این باکتری برای تأیید نهایی با روشهای استاندارد میکروبیولوژی، نظیر رنگ آمیزی گرم و تستهای بیوشیمیایی تشخیصی از قبیل تست همولیز، تست کاتالاز، تخمیر مانیتول، تست کوآگولاز و تست DNase ارزیابی شدند. سپس تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی، طبق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (2017) (CLSI) و به روش دیسک دیفیوژن آگار انجام گرفت. برای هر نمونه باکتری، سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد و به محیط مولر هینتون آگار تلقیح شد و دیسک‌ها با فاصله مناسب از یکدیگر قرار داده شدند تا پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرارگیری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، بررسی شوند. دیسک‌های آنتی بیوتیکی شامل تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم، پنی سیلین ۱۰ یونیت، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم، کوتریموکسازول ۲۳/۷۵/۱/۲۵ میکروگرم، توبرامایسین ۱۰ میکروگرم و سیپروفلوکساسین ۳۰ میکروگرم از شرکت پادتن طب تهیه شدند. تست‌ها دوبار تکرار شدند و با اندازه گیری قطر هاله‌ها، میزان مقاومت یا حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها بر اساس جدول CLSI تعیین شد.

به منظور استخراج DNA از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از کیت استخراج DNA (GENE ALL, Korea) استفاده شد.

درک رابطه پیچیده بین میزبان با میکروب‌های همزیست و عوامل بیماری‌زای مهاجم، بینش مهمی را برای طراحی منطقی داروها فراهم می‌کند. باکتری‌ها می‌توانند از طریق سیگنال‌های شبه هورمونی با یکدیگر ارتباط برقرار کرده و با تداخل در مسیرهای سیگنالینگ سلول به سلول ویروانس باکتری را کنترل می‌کنند (۲). استافیلوکوک اورئوس‌ها به خاطر داشتن فاکتورهای متعدد بیماری‌زا، تشکیل کلنی‌های پایدار و تهاجم به سیستم ایمنی، یکی از باکتری‌های به شدت بیماری‌زا هستند که می‌توانند عفونت‌های نکروزه کننده با واکنش‌های التهابی گسترده و تخریب بافت را ایجاد کنند. همه استافیلوکوکوس اورئوس‌ها توانایی ترشح فاکتورهای ویروانس لیز کننده سلول‌ها نظیر همولیزین‌ها را دارند (۳). از جمله پپتیدهای آسیب زنده به غشاء، همولیزین‌های آلفا، بتا، گاما و دلتا هستند که توسط استافیلوکوکوس اورئوس تولید می‌شوند (۴). همولیزین آلفا از مهم‌ترین فاکتورهای ویروانس استافیلوکوکوس اورئوس است (۵، ۶) که با تشکیل منافذی در غشا سلول، اجازه انتقال به مولکول‌های کوچک نظیر یون‌های K^+ و Ca^{2+} را می‌دهد و منجر به مرگ نکروتیک سلول‌های هدف می‌شود (۷). گاما همولیزین نیز منفذی در غشاء تشکیل می‌دهد، ولی بر خلاف آلفا همولیزین برای عملکرد خود به دو پلی پپتید دیگر نیز نیاز دارد. دو جزء پلی پپتیدی به نام‌های F و S در کروماتوگرافی به ترتیب با سرعت بالا و پایین از هم جدا می‌شوند. این همولیزین به خاطر لیز کردن گلبول‌های سفید در یوکاریوت‌ها به نام "لکوسیدین" نیز شناخته می‌شود (۸). بتا همولیزین، در غشاء سلول منفذ ایجاد نمی‌کند، بلکه با فعالیت آنزیمی اسفنگومیلیناز، اسفنگومیلین غشاء سلول را هیدرولیز می‌کند (۹). فعالیت آنزیمی بتا همولیزین جهت عملکرد همولیتیکی آن مورد نیاز است و در مورد گلبول‌های قرمز فعالیت لیز کنندگی آن در دمای پایین آغاز می‌شود (۷). دلتا همولیزین‌ها هم پپتیدهای کوچک دوگانه دوست با ساختار آلفا هلیکس هستند که با مکانیسم‌های متفاوتی فعالیت همولیتیکی خود را اعمال می‌کنند (۱۰).

مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند که عوامل ویروانس با نژاد خاصی از استافیلوکوکوس اورئوس مرتبط نیستند و شیوع بالای همولیزین‌ها نیز بیانگر نقش آنها در بیماری‌های خاص انسان است و همچنین فاکتور کلیدی در کلنی‌زایی و یا ایجاد بیماری به حساب می‌آید (۸).

هدف از این مطالعه، جداسازی و تشخیص باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها و ارزیابی

روش آماری

اطلاعات دموگرافیکی بیماران، نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن‌های همولیزین در نمونه‌ها، به کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ تحلیل شد و ارتباط آماری معنی‌دار با $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده، ۵۸ نمونه از زنان و ۴۲ نمونه از مردان جدا شد. ۹۱٪ نمونه‌ها سن بالای ۶۰ را داشتند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که بیشترین مقاومت در برابر کوتریموکسازول با ۶۳٪ و بیشترین حساسیت به پنی‌سیلین با ۵۳٪ دیده شد. الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج به دست آمده رابطه آماری معنی‌داری بین سن و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و کوتریموکسازول را نشان داد و بیانگر آن که با افزایش سن، میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز افزایش پیدا می‌کند. اما رابطه‌ای بین سن و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر وجود نداشت. در بررسی رابطه بین جنسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تنها ارتباط معنی‌دار بین جنسیت و مقاومت به

آنالیز کمی و کیفی DNAهای استخراج شده با دستگاه نانودراپ (Denovix, Italy) و ژل آگاروز ۱٪ ارزیابی شد.

برای انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، در هر میکروتیوب ۱۰ μL مستر میکس (Amplicon, Denmark) ۱ μL از پرایمرهای رفت و برگشت ۱۰ Pmol، ۱ μL از هر نمونه DNA استخراج شده (۱۰۰ ng) و ۱۲ μL آب مقطر دیونیزه اضافه شد. سپس واکنش PCR در دستگاه Thermal cycler (پندرف آلمان) با برنامه حرارتی شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل حرارتی شامل ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۵۰ ثانیه و در آخر یک مرحله طویل سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در انتها محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ در کنار کنترل‌های مثبت و منفی الکتروفورز شدند.

جهت کنترل کیفی از استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) استفاده شد و بعد از تایید تکثیر DNAهای استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی 23srRNA، فراوانی فاکتورهای ویروالاس همولیزین آلفا، بتا و دلتا در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به روش PCR ارزیابی شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. آنالیز کیفی محصولات PCR نیز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ انجام گرفت و تعدادی از محصولات PCR تعیین توالی شدند تا با بلاست کردن آنها در سایت NCBI تطابق و همپوشانی آنها تایید شود.

جدول ۱. جفت پرایمرهای استفاده شده در پژوهش

ژن	پرایمر	توالی پرایمر در جهت 5'→3'	سایز قطعه تکثیر شده (جفت باز)
23srRNA	رفت	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	۱۲۵۰
	برگشت	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	
HLA	رفت	AAATTGGGGACCATAACGACA	۱۵۷
	برگشت	AGCGAAGTCTGGTGAAAACC	
HLB	رفت	TGCTGGACATGATCGAAAAA	۲۱۳
	برگشت	TTTGATTGAGGGTCCCATGT	
HLD	رفت	TTGGGACGGCTTAATAACTCA	۱۷۲
	برگشت	GGAGTGATTTCAATGGCACA	

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بیماران

آنتی بیوتیک	درصد فراوانی جدایه‌های مقاوم	درصد فراوانی جدایه‌های حدواسط	درصد فراوانی جدایه‌های حساس
تتراسایکلین	۵۰٪	۳۱٪	۱۹٪
پنی‌سیلین	۱۶٪	۳۱٪	۵۳٪
جنتامایسین	۱۴٪	۳۷٪	۴۹٪
کوتریموکسازول	۶۳٪	۲۸٪	۹٪
توبرامایسین	۲۶٪	۳۱٪	۴۳٪
سیپروفلوکساسین	۲۸٪	۳۱٪	۴۱٪

بحث

استافیلوکوکوس اورئوسها توانایی گسترش مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی را دارند و فاکتورهای بیماری‌زای متعددی را ترشح می‌کنند که منجر به واکنش‌های التهابی در بدن می‌شوند (۱۱). در چند دهه اخیر، فعالیت‌های همولیتیکی و لکوتوکسیسیته استافیلوکوک اورئوس بسیار مورد توجه محققین بوده، اما با این وجود ماهیت مولکولی عوامل دخیل در بیماری‌زایی این باکتری‌ها، در حال شناسایی است. شناسایی گیرنده‌های میزبان برای این سموم آسیب رساننده به غشاء، احتمالاً در مورد عملکردهای فیزیولوژیکی خاص این عوامل، بینش جدیدی را ایجاد می‌کند و علاوه بر این، نقش همولیزین‌ها در ایجاد تعادل بین همزیستی و عفونت نیز مشخص خواهد شد (۱۲).

استافیلوکوکوس‌ها به عنوان بخشی از فلور نرمال، ایجاد کننده بیماری‌های فرصت طلب و عفونت‌های سیستمیک هستند. مهم‌ترین راهکار برای مقابله با افزایش شیوع عفونت‌های مرتبط با این باکتری‌ها شناسایی و درمان به موقع بیماری است (۱۳)، اما مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از مهم‌ترین مشکلات برای سلامت عمومی در همه جای دنیا به حساب می‌آید که استفاده از داروهای ضد میکروبی در درمان بیماری‌های عفونی را محدود می‌کند (۱۴).

توانایی آنتی بیوتیک‌ها در تغییر دادن فنوتیپ‌های میکروارگانیسم‌ها و ایجاد قدرت بیماری‌زایی بالا نشان دهنده عوارض سوء مصرف آنهاست. استفاده بیش از حد، نه تنها در ایجاد مقاومت در برابر دارو و از بین رفتن میکروبیوتای میزبان دخیل است بلکه سبب انتخاب ارگانیسم‌هایی با شدت بیماری‌زایی بالا می‌شود (۱۵). در این مطالعه میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس‌های موجود در زخم و ادرار مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس فراوانی ژن‌های همولیزین در جدایه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها ارزیابی شد. نتایج نشان داد که جدایه‌ها سطح بالایی از مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول ۶۳٪، تتراسایکلین ۵۰٪، سیپروفلوکساسین ۲۸٪، توبرامایسین ۲۶٪ و کمترین مقاومت‌ها را آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین ۱۶٪ و جنتامایسین ۱۴٪ از خود نشان دادند.

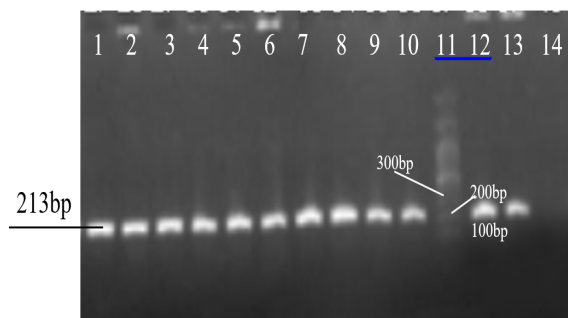
نوربخش و همکارانش در سال ۲۰۱۵ الگوی مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از بیمارستان‌های اصفهان را برای آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین (۹۰/۲٪)، اریترومایسین (۸۹/۷٪)، سیپروفلوکساسین (۸۹/۵٪)، پنی

سیپروفلوکساسین مشاهده شد و زنان مقاومت بیشتری نسبت مردان داشتند.

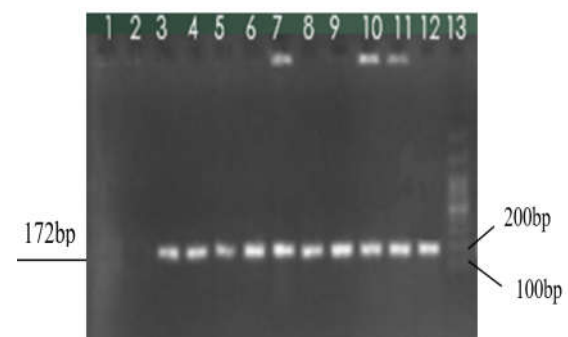
توزیع فراوانی فاکتورهای ویروالانس همولیزین نیز نشان داد که همولیزین آلفا در ۹۱٪ نمونه‌ها (شکل ۱)، همولیزین بتا در ۹۶٪ نمونه‌ها (شکل ۲) و همولیزین دلتا در ۹۹٪ نمونه‌ها (شکل ۳) مثبت بودند.



شکل ۱. نتایج حاصل از تکثیر ژن همولیزین آلفا در نمونه‌ها. چاهک ۱ کنترل منفی، چاهک ۲ و ۱۱ نمونه‌های منفی، چاهک ۳ تا ۱۰ نمونه‌های مثبت، چاهک ۱۲: کنترل مثبت و چاهک ۱۳: مارکر 100bp



شکل ۲. نتایج حاصل از تکثیر ژن همولیزین بتا در نمونه‌ها. چاهک ۱-۱۰: نمونه‌های مثبت، چاهک ۱۱ مارکر 100bp، چاهک ۱۲: کنترل مثبت، چاهک ۱۳ نمونه مثبت و چاهک ۱۴ نمونه منفی



شکل ۳. نتایج حاصل از تکثیر ژن همولیزین دلتا در نمونه‌ها. چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳-۱۲: نمونه‌های مثبت، چاهک ۱۳ مارکر 100bp

سیلین (۸۸٪)، تتراسایکلین (۸۲/۴٪) و جنتامایسین (۷۵/۸٪) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های نیتروفوران‌توئین (۲٪) و ونکومایسین (۱۰٪) گزارش کردند (۱۶).

پرهیزگاری و همکارانش در سال ۲۰۱۳ الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیمارستان‌های اهواز را به صورت ۳۷/۲٪ مقاوم به متی‌سیلین گزارش کردند و از این تعداد سوبه‌های مقاوم به متی‌سیلین، نسبت به کلرامفنیکل ۳/۳۸٪، ریفامپین ۴۵/۷۶٪، نورفلوکساسین ۸۹/۸۳٪، جنتامایسین ۸۹/۸۳٪، سیپروفلوکساسین ۹۱/۵۲٪، آزیترومایسین ۸۸/۱۳٪، کوتریموکسازول ۸۶/۴۴٪ بود و تمام سوبه‌ها نسبت به ونکومایسین و نیتروفوران‌توئین حساس گزارش شدند (۱۷).

در مطالعه Akhi و همکارانش در سال ۲۰۱۵، از زخم‌های پای افراد دیابتی در تبریز، ۳۵٪ استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده مقاوم به متی‌سیلین بودند. همچنین مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مورد مطالعه ۵۳/۸٪، مقاومت به آموکسی کلاو ۳۰/۷۶٪ و مقاومت به تتراسایکلین ۴۶/۱۵٪ بود و ۱۰۰٪ جدایه‌ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند (۱۸).

با توجه به متفاوت بودن نتایج حاصل از مطالعات انجام شده در مناطق مختلف کشور و تغییر الگوی مقاومت در طول زمان، بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های بالینی هر منطقه، امری ضروری خواهد بود. همچنین افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، به دلیل مصرف روز افزون و بی رویه آن در مناطق مختلف دنیا و موقعیتهای جغرافیایی متفاوت نیز دیده شده است. به طوری که در مطالعه Shittu و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در نیجریه، حساسیت ۶۸ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در بالاترین سطح مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های تیکوپلانین، ونکومایسین، ریفامپیسین، موپیروسین (۱۰۰٪) و سولفامتوکسازول-تری متوپریم (۷۲٪) و تتراسایکلین (۵۵٪) گزارش شد (۱۹). در بررسی Yılmaz و همکارانش در سال ۲۰۱۷ از ترکیه، ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی‌سیلین در ۸۳/۵٪، آمپی سیلین ۷۷/۳٪، اریترومایسین ۶۳/۹٪، تتراسایکلین ۱۶/۵٪، کلیندامایسین ۶/۲٪ و جنتامایسین ۶/۲٪ موارد مشاهده شد (۱۴).

همولیزین‌ها از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زا در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد کننده عفونت هستند که در مطالعه حاضر نیز فراوانی بالایی داشتند. به طوری که

همولیزین آلفا (HLA) در ۹۱٪ نمونه‌ها، همولیزین بتا (HLB) در ۹۶٪ و همولیزین دلتا (HLD) در ۹۹٪ نمونه‌ها مثبت بودند. حضور هر سه ژن در بیشتر جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک نشان دهنده نقش این ژن‌ها در بیماری‌زای است. در راستای نتایج حاضر، در مطالعه امینی و همکارانش در سال ۲۰۱۹، از ۵۹ نمونه تهیه شده از زخم کودکان، فراوانی ژن HLA ۷۱/۲٪، HLB ۵۷/۶٪ و HLD ۹۶/۶٪ گزارش شد. در بررسی دیگری که نمونه‌ها از پای عفونی افراد دیابتی توسط آقای رسولی و همکارانش تهیه شده بود، از ۳۰ نمونه در ۱۴ مورد استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شد که دارای ژن HLA به میزان ۱۰۰٪ و HLG ۶۴/۲٪ بودند (۲۰). علاوه بر نمونه‌های انسانی در بررسی دیگری استافیلوکوکوس اورئوس از ورم پستان گاو، گوسفند و بز جدا شد و از ۴۵ نمونه مثبت، فراوانی ژن HLA ۳۵/۵٪، HLB ۲۰٪، هر دو ژن با هم ۱۷/۷۸٪، و HLD ۲۶/۶۷٪ مشاهده شد (۲۱).

در مطالعه Nasaj و همکارانش مقاومت آنتی بیوتیکی و شیوع ژن‌های همولیزین در استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی بررسی شد و نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در برابر سفوکسیتین در ۴۹ جدایه (۵۳/۸٪) و کمترین مقاومت در برابر نوویوسین در ۵ جدایه (۵/۵٪) مشاهده شد. هیچ یک از جدایه‌ها به ونکومایسین مقاوم نبودند. شیوع ژن‌های hla، hla_yidD، hld و hlb به ترتیب ۸۷،۹٪، ۶۲،۶٪، ۵۶٪ و ۴۷،۳٪ بود (۲۲).

سوبه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی، مقاومت بالایی نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها داشتند و ارتباط معنی‌داری بین سن و مقاومت آنتی‌بیوتیکی تتراسایکلین و کوتریموکسازول برقرار بود و با افزایش سن میزان مقاومت آنتی بیوتیکی افزایش می‌یافت. همچنین ارتباط معنی‌داری بین جنس و مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین برقرار بود و میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در زنان بیشتر از مردان بود، اما با مقایسه حضور ژن‌های همولیزین و ارتباط آنها با مقاومت آنتی بیوتیکی، سن و جنس رابطه معنی‌داری دیده نشد.

عفونت با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بسیار شایع است. با توجه به پتانسیل بالا در بروز مقاومت آنتی بیوتیکی و اهمیت بالینی توکسین‌های این باکتری از لحاظ بیماری‌زایی، شناسایی و بررسی آنها با تکنیک‌های مولکولی و استفاده از روش‌های درمانی مناسب برای کنترل عفونت ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل آزمایشگاه‌ها و بیمارانی که در انجام این طرح همکاری داشتند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

REFERENCES

1. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41: 430-449.
2. Curtis, MM, Sperandio V. A complex relationship: the interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host. *Mucosal Immunol* 2011;4: 133-8.
3. Kebaier Ch, Chamberland RR, Allen IC, Gao X, Broglie PM, Hal JD, Jania C, et al. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J Infect Dis* 2012;205:807-17.
4. Wiseman, GM. The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol Rev* 1975;39:317-44.
5. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13473-8.
6. Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN, et al. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol* 2011;79:814-25.
7. Burnside K, Lembo A, de Los Reyes M, Iliuk A, Binhtran NT, Connelly JE, et al. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS One* 2010;5:e11071.
8. Ventura CL, Malachowa N, Hammer CH, Nardone GA, Robinson MA, Kobayashi SD, DeLeo FR. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS One* 2010;5:e11634.
9. Ira, Johnston LJ. Sphingomyelinase generation of ceramide promotes clustering of nanoscale domains in supported bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:185-97.
10. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Héchard Y. delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 2009;30:817-23.
11. Zhang L, Gao J, Barkema HW, Ali T, Liu G, Deng Y, et al. Virulence gene profiles: alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China. *BMC Vet Res* 2018;14:63.
12. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:12.
13. Karasartova D, Cavusoglu ZB, Turegun B, Ozsan MT, Şahin F. Identification of virulence genes carried by bacteriophages obtained from clinically isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2016;63:433-447.
14. Yılmaz EŞ, Aslantaş Ö. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pac J Trop Med* 2017;10:1059-1064.
15. Goneau L W, Delpont J, Langlois L, Poutanen S M, Razvi H, Reid G, et al. Issues beyond resistance: inadequate antibiotic therapy and bacterial hypervirulence. *FEMS Microbes* 2020;1: 1-14.
16. 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: 356-363. [In Persian]
17. Parhizgari, N., S. Moosavian, and A. Sharifi. Antibiotic resistant pattern of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from patients during 2009-2010. *Armaghane Danesh* 2013;18: 757-767. [In Persian]
18. Akhi MT, Ghotaslou R, Asgharzadeh M, Varshochi M, Pirzadeh T, Memar MY, et al. Bacterial etiology and antibiotic susceptibility pattern of diabetic foot infections in Tabriz, Iran. *GMS Hyg Infect Control* 2015;10: 02.
19. Shittu AO, Okon K, Adesida, S. Omotayo Oyedara, Witte W, Strommenger B, Layer F, et al. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Nigeria. *BMC Microbiol* 2011;11: 92.
20. Rasooli, H. and E. Ghorbanalinezhad. Isolation and Identification of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Based on hla, lukED, sei, and hlg Virulence Genes in Patients with Diabetic Foot Infection in Mazandaran Province. *Iran J Med Microb* 2018;11:192-202. [In Persian]
21. Ghasem Azizi A, Masoud H, Pourtaghi H., Shirazinezhad A., Naserpour F. Phenotypic and Genotypic Analysis of Haemolysin Genes of *Staphylococcus aureus* isolated from Subclinical Mastitis in Savojbolagh County, Alborz Province. *Vet J* 2016; 114: 14-20. [In Persian]
22. Nasaj M, Saeidi Z, Asghari B, Roshanaei G, Arabestani MR. Identification of hemolysin encoding genes and their association with antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Res Notes* 2020;13:68.