

## شناسایی الگوی ژن های مولد توکسین های Sec، Hla، Pvl و Tsst-1 در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

زهرا فتحعلی<sup>۱</sup>، محسن میرزائی<sup>۲\*</sup>، شهین نجار پیرایه<sup>۳</sup>

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران

(۲) گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران

(۳) گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۴

### چکیده

**مقدمه:** استافیلوکوکوس اورئوس طیف وسیعی از آگزوتوکسین هایی را تولید می کند که در ایجاد بیماری در میزبان نقش دارند. تقریباً همه سویه های گروهی از سیتوتوکسین ها را تولید می کنند. سوپر آنتی ژن های پیروژنیک (PTSAg) گروهی از آگزوتوکسین ها هستند که توسط استافیلوکوکوس اورئوس تولید می شوند. این گروه شامل سم TSST-1 و همه انترتوکسین های این باکتری می باشند. هدف این مطالعه شناسایی ژن های sec، tsst-1، pvl و hla در جدایه های بالینی MRSA بود.

**مواد و روش ها:** در این تحقیق، تعداد ۲۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران جمع آوری شد. تمامی جدایه ها با روش های استاندارد تعیین هویت شدند. تمامی جدایه ها از نظر مقاومت نسبت به متی سیلین با روش فنوتیپی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس شناسایی ژن های sec، tsst-1، pvl و hla با استفاده از روش Multiplex PCR صورت گرفت.

**یافته های پژوهش:** از ۲۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی ۹۵ جدایه با استفاده از روش انتشار از دیسک اگزاسیلین و مولکولی به عنوان مقاوم نسبت به متی سیلین شناسایی شدند. از این ۹۵ جدایه، فراوانی ژن های sec، tsst-1، hla و pvl به ترتیب ۶۰٪، ۳/۱۵، ۹۳/۶۸ و ۴/۲۱ درصد بود. هم چنین ۳ (۳/۱۵ درصد) جدایه از لحاظ سه ژن hla، tsst-1 و pvl مثبت بودند.

**بحث و نتیجه گیری:** سویه های استافیلوکوکوس اورئوس که توکسین های Sec، Hla، Pvl و TSST-1 تولید می کنند یک تهدید جدی برای سلامت انسان ها محسوب می شوند. فراوانی بالای برخی از ژن های مولد توکسین در این مطالعه می توان نشان دهنده ظهور جدایه های واجد این ژن ها در بیمارستان های تهران باشد.

**واژه های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، توکسین سندرم شوک توکسیک-۱، لوکوسیدین پنتون والنترین، آلفا توکسین، انترتوکسین C

\*نویسنده مسئول: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران

Email: Mirzaei.iaub@gmail.com

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک عامل مهم بیماریزا در بیمارستان شناخته می شود. این باکتری یک بیماریزای فرصت طلب است که زیستگاه طبیعی آن اپی تلایوم سنگفرشی مجرای قدامی بینی است. تقریباً به طور ثابت در ۲۰ درصد جمعیت کلونیزه شده و به طور متناوب (گذرا) در ۵۰ درصد جمعیت نیز شناسایی شده است (۱).

استافیلوکوکوس اورئوس فاکتور های ویروالانس بسیاری دارد که طیف گسترده ای از عفونت ها را سبب می شود. برخی از این عوامل باعث اتصال باکتری به سطوح شده و برخی مانع از عملکرد سیستم ایمنی می شوند، همه این عوامل می توانند باعث ایجاد آسیب در میزبان شوند (۲،۳). استافیلوکوکوس اورئوس طیف گسترده ای از آگزوپروتئین ها و توکسین های پروتئینی را تولید می نماید که در روند بیماریزایی باکتری موثر می باشد. از سوی دیگر استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت های پوست و بافت های نرم و هم چنین باکتری می باشد که از طریق بیمارستان یا جامعه کسب می شوند (۴،۵). آگزوتوکسین هایی از قبیل توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ (TSST-1) و انتروتوکسین C متعلق به گروهی از توکسین ها هستند که به عنوان سوپر آنتی ژن های پیروژنیک (PTSAgs) شناخته شده اند (۶،۷). TSST-1 توسط ژن *tstH* رمز می شود روی کروموزوم باکتری ها درون عناصر ژنتیکی متحرک kb ۱۵/۲ تحت عنوان جزایر پاتوژنیسیته-۱ استافیلوکوکی قرار دارد. TSST-1 نقش سوپر آنتی ژنی (SAGs) دارد. سوپر آنتی ژن ها با فعال سازی ناحیه متغیر VB روی گیرنده سلول های T (TCR) و MHC کلاس ۲ باعث تحریک سلول های T می شوند. سلول های T فعال شده سایتوکاین هایی از قبیل اینترلوکین-۱ و TNF- $\alpha$  آزاد کرده که این عوامل باعث ایجاد شوک و آسیب بافتی می شوند (۸).

انتروتوکسین C به طور افقی و از طریق جزایر پاتوژنیسیته منتقل شده و باعث مسمومیت غذایی می شود. استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تولید توکسین های مختلفی مانند توکسین آلفا، بتا، گاما، دلتا و

لکوسیدین می باشد (۹-۱۲). استافیلوکوکوس اورئوس توکسین های سایتولیتیک متعددی شامل آلفا توکسین، لکوسیدین پنتون والتین را نیز می تواند ترشح نماید (۱۳). آلفا توکسین که توسط ژن *hla* کد می شود یک توکسین منفذ ساز است و روی طیف وسیعی از سلول های میزبان از جمله اریتروسیت ها، سلول های اپی تلایال، اندوتلیال، منوسیت ها و ماکروفاژها اثرات سایتولیتیک دارد، هم چنین با عفونت های بافت نرم و عفونت پوستی شدید، پنومونی نکروز شونده و حتی سپسیس مرتبط است (۱۴،۱۵). لکوسیدین پنتون والتین یک توکسین سایتولیزین است و دارای دو جزء پروتئینی S (33 kDa) و F (34 kDa) تحت کنترل ژن های *LuK F-PV* و *LuK S-PV* می باشد. هر دو جزء لکوسیدین آنتی ژنیک بوده و قابل تبدیل به توکسوئید می باشند. این توکسین با مقاومتی که در مقابل فاگوسیتوز ایجاد می کند، باعث افزایش قدرت تهاجمی استافیلوکوکوس می شود (۱۶-۱۸). لکوسیدین پنتون والتین با منافذی که در نوتروفیل ها ایجاد می کند، باعث ورود کاتیون ها به درون نوتروفیل ها و تخریب آن ها می شود. این توکسین منحصراً روی لکوسیت ها تاثیر دارد. لکوسیدین با تخریب لکوسیت ها و نهایتاً کاهش دادن تعداد آن ها در بدن میزبان می تواند به عنوان یک عامل ویروالانس عمل کنند (۱۹،۲۰). با توجه به این که روش PCR و Multiplex PCR به عنوان یک روش بسیار دقیق و تشخیص سریع مطرح شده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی ژن های کدکننده *sec*، *tsst-1*، *pvl* و *hla* در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بود.

## مواد و روش ها

در مجموع ۲۰۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان شهر تهران در طی مدت ۶ ماه جمع آوری گردید. برای تعیین هویت باکتری ها از روش استاندارد میکروب شناسی رنگ آمیزی گرم، بررسی تولید کاتالاز، کوآگولاز (اسلایدی و لوله ای)، DNase، آزمایش اکسیداز، رشد در محیط MSA و اوره از مورد استفاده قرار گرفت. جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس کشت داده شده در محیط TSB به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب شناسی دانشگاه

آزاد انتقال داده شد. سپس این باکتری ها را در محیط BHI برات حاوی ۲۰ درصد گلیسرول تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی گراد فریز شدند.

شناسایی جدایه های مقاوم به متی سیلین: جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) به صورت فنوتیپی با استفاده از روش انتشار از دیسک و با استفاده از دیسک های اگزاسیلین و سفوکسیتین تهیه شده از شرکت MAST (انگلستان) طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) شناسایی شدند. به دلیل مقاومت ناهمگن در بین جدایه های MSRA از هر دو روش جهت تأیید شناسایی ایزوله ها استفاده شد. تشخیص MRSA در جدایه های مورد بررسی با نتیجه مثبت در روش های بالا به استفاده از روش PCR تأیید شدند.

استخراج DNA ژنومیک: ابتدا نمونه ها بر روی محیط بلادآگار پاساژ داده شد، سپس یک کلنی از محیط را برداشته و در محیط BHI برات درون اپندورف ۱/۵ میلی متری کشت داده و به مدت ۲۰-۱۸ ساعت انکوبه کرده. سپس استخراج DNA را طبق پروتکل تهیه شده از کیت سینا کلون انجام داده شد. سپس برای بررسی و تعیین غلظت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر (ependorf) استفاده شد. انتخاب پرایمرهای اختصاصی مورد نیاز در این تحقیق بر اساس مقالات انتخاب گردید. توالی پرایمرها را در سایت NCBI مجدداً Blast شدند. پرایمرها از شرکت پیشگام (Pishgam) تهیه شدند، توالی اولیگو نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ آورده شده است (۲۱).

واکنش PCR: سپس جدایه های تولیدکننده توکسین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش Multiplex PCR در دستگاه ترموسایکلر (BIORAD) بررسی شدند (جدول شماره ۱). واکنش PCR در ۴۰ سیکل مطابق جدول شماره ۲ انجام

گرفت. واکنش Multiplex PCR در حجم نهایی ۵۰ μl انجام شد. ردیابی محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵ درصد با الکتروفورز با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت. سپس ژل به وسیله رنگ Safe stain رنگ آمیزی شد سپس ژل را در زیر تابش اشعه UV در دستگاه ترنسلومیناتور مشاهده شد و در نهایت اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار Excel تجزیه و تحلیل گردید. سویه های کنترل مثبت واجد ژن های مورد بررسی از بخش باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شدند.

### یافته های پژوهش

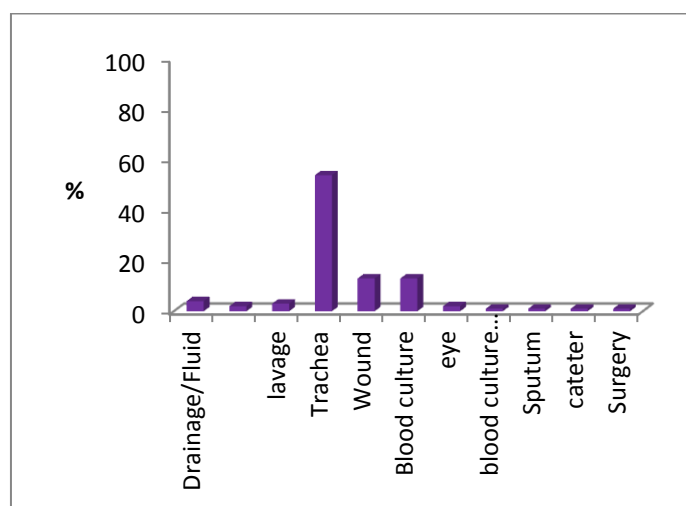
در ۹۵ جدایه MRSA مورد بررسی، ۵۷ (۶۰ درصد) نمونه ژن tsst-1 دارا بودند. ۳ (۳/۱۵ درصد) ایزوله دارای ژن sec و ۸۹ (۹۳/۶۸ درصد) ایزوله دارای ژن hla بود. ۴ (۴/۲۱ درصد) جدایه ژن pvl مثبت بودند. فراوانی مکانی ۹۵ ژن توکسین استافیلوکوکوس اورئوس جمع آوری شده از بیمارستان های مورد بررسی عبارت بود از ۳۸/۹۴ درصد نمونه ها از بخش ICU، ۲۲/۱۰ درصد از بخش عفونی، ۱۳/۶۸ درصد از بخش داخلی، ۱۲/۶۳ درصد از بخش جراحی، ۸/۴۲ درصد از بخش اطفال، ۴/۲۱ درصد از بخش اورژانس بود. فراوانی نوع نمونه ها عبارت از ۵۶/۸۴ درصد از تراشه، ۱۳/۶۸ درصد از کشت خون، ۱۳/۶۸ درصد از زخم، ۴/۲۱ درصد از مایعات مختلف، ۳/۱۵ درصد لاواژ، ۲/۱۰ درصد از چشم، ۲/۱۰ درصد از تراشه برانکو آلوتولار، ۱/۰۵ درصد از خلط سینه، ۱/۰۵ درصد از جراحی، ۱/۰۵ درصد از کاتتر بود (نمودار شماره ۱). پس از مطالعه ۹۵ جدایه توسط روش Multiplex PCR و مشاهده این ژن ها بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد، وجود قطعه ۳۹۸ bp نشان دهنده وجود ژن tsst-1، قطعه ۷۴۴ bp نشان دهنده وجود ژن hla، وجود قطعه ۵۰۲ bp نشان دهنده ژن pvl وجود قطعه ۹۰۰ bp نشان دهنده ژن sec بود (تصویر شماره ۱).

جدول شماره ۱. مشخصات پرایمرهای اختصاصی ژن های (tsst-1, pvl, hla, sec) توکسین استافیلوکوکوس اورئوس در واکنش PCR (۲۱).

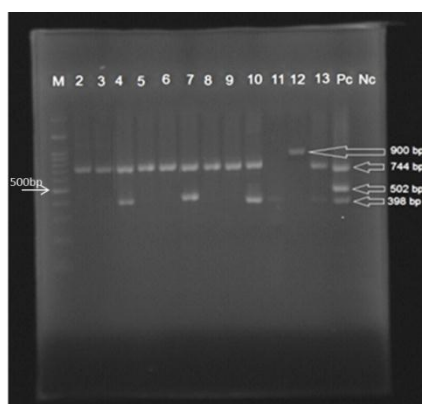
Targets	Primer	Sequences	Product size (bp)
tsst1	F	TTATCGTAAGCCCTTTGTTG	398
	R	TAAAGGTAGTTCTATTGGAGTAGG	
pvl	F	GGAAACATTIATICTGGCTATAC	502
	R	CTGGATTGAAGTTACCTCTGG	
hla	F	CGGTACTACAGATATTGGAAGC	744
	R	TGGTAATCATCACGAACTCG	
sec	F	GGGAATGTTGGATGAAGG	900
	R	AGGCAAGCACCGAAGTAC	

جدول شماره ۲. برنامه دمایی-زمانی بهینه شده پرایمرهای ژن های توکسین (tsst-1, pvl, hla, sec) واکنش PCR (۲۱).

مرحله	دما (°C)	زمان	تکرار سیکل
Initial Denaturation	۹۴	۵ دقیقه	
Denaturation	۹۴	۴۰ ثانیه	۴۰
Annealing	۶۰	۴۰ ثانیه	
Extension	۷۲	۱ دقیقه	
Final Extension	۷۲	۵ دقیقه	
Holding	۴		-



نمودار شماره ۱. فراوانی نسبی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مورد بررسی به تفکیک نوع نمونه بالینی



تصویر شماره ۱. محصولات حاصل از PCR ژن های: باند ۳۹۸، ۵۰۲، ۷۴۴ و ۹۰۰ جفت بازی حاصل از پرایمرهای مورد استفاده به ترتیب برای ژن های tsst-1، pvl، hla و sec. PC: نمونه کنترل مثبت، NC: نمونه کنترل منفی  
M: مارکر مولکولی (ladder) با وزن ۱۰۰ bp.

## بحث و نتیجه گیری

اولین جایگاه اکولوژیکی استافیلوکوکوس اورئوس بینی انسان است و انتقال این باکتری از طریق بینی افراد باعث افزایش عفونت های استافیلوکوکوسی به خصوص در زمان بستری شدن در بیمارستان یا ضعف سیستم ایمنی می شود. این باکتری یکی از مهم ترین عوامل عفونت های منتقله از بیمارستان (Nosocomial) می باشد (۲۲). استافیلوکوکوس اورئوس فاکتورهای ویروالانس متنوعی را تولید می کند. عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس تحت تاثیر حضور مقاومت آنتی بیوتیکی و عوامل موثر در بیماریزایی قرار دارد. کسب مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری باعث ایجاد یک سری تغییرات در ترشح و بیان عوامل موثر در بیماریزایی از جمله سموم باکتریایی می شود.

روش های متعددی برای شناسایی توکسین های استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله این روش ها می توان به روش الایزا، آگلوتیناسیون لاتکس، ایمونواسی لاتکس، ایمونودیفیوژن، رادیو ایمونواسی اشاره کرد. در همه روش های ذکر شده، باید شرایط لازم برای واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی فراهم باشد. در روش هایی از قبیل PCR و Multiplex PCR به آنتی ژن نیاز نیست، یکی از مزایای این روش ها این است که چنان چه میزان توکسین ها کم باشد، ژن ها قابل ردیابی هستند (۲۳). روش PCR که اساس آن تکثیر قطعات اختصاصی ژن های تولیدکننده توکسین است، ابزار مناسبی جهت تشخیص سریع، حساسیت و ویژگی قابل توجهی نسبت به سایر روش ها برای ژن های توکسین استافیلوکوکوس اورئوس دارا می باشد (۲۷-۲۴).

نوروزی و همکاران در سال ۱۳۸۹، شناسایی ژن *tst* استافیلوکوکوس اورئوس را با روش PCR مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از ۸۰ جدایه مورد بررسی، ۷ جدایه (۱۷/۵ درصد) دارای ژن *tst* و ۱۴ جدایه (۳۵ درصد) دارای ژن *sec* بودند (۲۵). تیهو و همکاران در سال ۱۳۹۰ توزیع فراوانی ژن *tst* را در ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند ژن *tst* در ۲۰ جدایه (۲۰ درصد) از استافیلوکوکوس های مورد

بررسی گزارش شد (۲۶). در پژوهش حاضر ۵۷ (۶۰ درصد) جدایه های استافیلوکوکوس مورد بررسی واجد ژن *tst* بودند. اصلانی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در مجموع ۶۵ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر فراوانی ژن های *sec*، *tst* مورد بررسی قرار دادند. در ۱۸ جدایه (۲۷/۶ درصد) دارای ژن *tst*، ۲ جدایه (۳ درصد) دارای ژن *sec* بودند (۲۷). نتایج ما نشان داد که میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس حامل ژن *tst* در بیمارستان های مورد بررسی موضوع نگران کننده ای است. گردش این ایزوله ها در اجتماع به ویژه برای افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در کشور ما جمعیت کمی را به خود اختصاص نمی دهند دارای اهمیت است. در سال ۲۰۱۳، Becker و همکاران در آلمان در ۲۱۹ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، ۴۰ جدایه (۱۸/۲ درصد) دارای ژن *tst*، ۱۹ جدایه (۸/۶ درصد) دارای ژن *sec* را شناسایی کردند (۲۸). در سال ۲۰۰۸ Ran Peck و همکاران در کره، از ۷۰ نمونه کلینیکی، ۳۴/۳ درصد جدایه های مورد بررسی واجد ژن *sec* بودند (۲۹). در مطالعه حاضر ۳ (۳/۱۵ درصد) جدایه دارای ژن *sec* بودند. علت عمده این تفاوت ها می تواند در میزان فراوانی سویه های انتروتوکسی ژنیک مختلف در این تحقیق با سایر مطالعات باشد، هم چنین این تفاوت ها ممکن است مربوط به منشاء جداسازی باکتری ها باشد. در سال ۲۰۱۰، Shukla و همکاران در ایالت متحده فراوانی ژن *hla* ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۳۰). در سال ۲۰۰۲ Keteet و همکاران نیز فراوانی ژن *hla* ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۳۱). در مطالعه حسینی الفاطمی و همکاران در سال ۱۳۹۳ فراوانی ژن *hla* ۸۴/۲۴ درصد گزارش گردیده است (۳۲). در مطالعه حاضر ۸۹ (۹۳/۶۸ درصد) جدایه مورد بررسی، واجد ژن *hla* بودند. با توجه به مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان، می توان نتیجه گرفت که فراوانی نسبی این ژن در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس بسیار بالا است.

مبین و همکاران در سال ۱۳۹۰، ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس را مورد بررسی قرار دادند، در بین این جدایه ها ۱۸ (۱۸ درصد) از نظر وجود ژن

باشد که روی سلول های اپی تلیال تراشه یک سری رسپتور به نام ADAM10 برای آلفا توکسین وجود دارد، آلفا توکسین به این رسپتورها متصل شده باعث ایجاد منافذی در این سلول ها می شود. این منافذ باعث خروج یون  $K^+$  و ورود  $Na^+$  و  $Ca^{2+}$  به داخل غشاء سلول شده و در نهایت باعث ایجاد اثرات سایتولیتیک، همولیتیک، درمونکروتیک و فعالیت های کشندگی روی طیف وسیعی از سلول ها مانند منوسیت ها، لنفوسیت ها، ماکروفاژها، سلول های اپی تلیال، فیروبلاست می شوند.

عفونت با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بسیار شایع بوده با توجه به پتانسیل بالا و اهمیت بالینی توکسین های این باکتری از لحاظ بیماری های بسیار مهمی که ایجاد می کند همین طور بروز مقاومت آنتی بیوتیکی آن لزوم شناسایی و بررسی بیشتر آن ها با استفاده از روش های درمانی مناسب و کنترل عفونت ضروری می باشد. لذا بهتر است با استفاده از روش های تشخیصی مناسب عامل ایجادکننده عفونت به درستی تشخیص داده شود، از این رو استفاده از روش های مولکولی می تواند بسیار مفید باشد. نظارت بر جدایه های واجد ژن های ویروالانس مقاوم به دارو در بیمارستان ها می تواند در کنترل موارد خطرناک در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و بیماران حساس موثر باشد. چه بسا که تا به امروز تدابیر و چاره اندیشی در این حیظه محدود به کشورهایی بوده است که در این زمینه نسبت به گزارش های گذشته و حال خود آگاهی دارند.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله لازم می دانند بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد جهت تامین امکانات و همکاری صمیمانه در انجام این پروژه قدردانی نمایند.

### References

1. Hu DL, Maina EK, Omoe K, Inoue F, Yasujima M, Nakane A. Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome mec genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Tohoku J Exp Med* 2011; 225: 161-9.

pvl مثبت گزارش گردید(۳۳). هوایی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ۱۴۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سلین بیش از ۹۴ درصد سویه های pvl مثبت، مربوط به عفونت های پوستی و تراشه، خون و ادرار گزارش نمود. در این مطالعه ۵۵/۵ درصد pvl مثبت مربوط به خون و ادرار بودند و هیچ جدایه pvl مثبت در بین جدایه های حاصل از تراشه مشاهده نشد(۳۴). در مطالعه مقدم از ۵۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴/۳ درصد جدایه های مورد بررسی واجد ژن pvl بودند(۳۵). به طور کلی تفاوت در نتایج این مطالعات می تواند به دلیل اختلاف در منطقه جغرافیایی و نوع نمونه اخذ شده باشد.

در این مطالعه ۴ جدایه(۴/۲۱ درصد) دارای هر دو ژن tsst-1, pvl بودند. البته تولید همزمان توکسین TSST-1 و PVL در سایر مطالعات گزارش نشده است. در مطالعه ما اکثر جدایه های مورد بررسی واجد ژن کدکننده TSST-1 و آلفا توکسین بودند. TSST-1 و انتروتوکسین C خاصیت سوپر آنتی ژنیک داشته و باعث افزایش ترشح سایتوکاین های التهابی هم چون IL-2, IL-1, TNF- $\alpha$  می شوند. تولید بیش از حد این سایتوکاین های باعث ایجاد شوک می شوند. ژن کدکننده sec و tsst-1 روی قطعات کروموزومی قرار دارد، اما نسبت به ژن کدکننده لکوسیدین پنتون والتین و انتروتوکسین C از فراوانی کمتری برخوردار هستند. این امر ممکن است به این دلیل باشد که سویه های مولد PVI. سویه های اکتسابی از جامعه هستند، بنا بر این از شیوع کمتری در بیمارستان ها برخوردار هستند. همان طور که مشاهده شد جدایه های واجد ژن hla با فراوانی بیشتری از نمونه های حاصل از تراشه جدا شدند، این پدیده ممکن است به این دلیل

2. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339: 520-32.

3. Holmes A, Ganner M, Mcguane S, Pitt T, Cookson B, Kearns A. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales frequency characterization and association

- with clinical disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2384-90.
4. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2000; 61: 1-10.
  5. Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 67-72.
  6. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvinmarche E, Mariuzza R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. *J Infec Dis* 2004; 189: 2334-6.
  7. Holtfreter S, Broker B. Staphylococcal superantigens do they play a role in sepsis. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53: 13-27.
  8. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* 1998; 29: 527-43.
  9. Schlebusch S, Schooneveldt JM, Huygens F. Prevalence of Staphylococcus aureus strains in an Australian Cohor 1989–2003 evidence for the low prevalence of the Toxic Shock Toxin and Panton-Valentine Leukocidin genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 1183-89.
  10. Clark J. A brief review of Panton-Valentine Leukocidin producing staphylococcal Infections in the intensive therapy unit. *Curr Anaesth Crit Care* 2008; 19: 330-2.
  11. Christiane W, Wolfgang W, Christiane G. Insertion of host DNA into PVL-Encoding phages of the Staphylococcus aureus lineage ST80 by intra-chromosomal recombination. *J Virol* 2010; 406: 322-7.
  12. Sachiko N, Jun K, Junichi C, Yves P, Sophie J, Jerome E, et al. Phage conversion of Panton-Valentine Leukocidin in Staphylococcus aureus molecular analysis of a PVL-converting phage phiSLT. *J Gene* 2001; 268: 195-206.
  13. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial twocomponent and hetero heptameric pore-forming cytolytic toxins structures pore forming mechanism and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68: 981-1003.
  14. Berube BJ, Bubeck WJ. Staphylococcus aureus  $\alpha$ -toxin nearly a century of intrigue. *Toxins* 2013; 5: 1140-66.
  15. Ong L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. Structure of Staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996; 274: 1859-65.
  16. Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, Oconnell 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: 2554-63.
  17. Morgan MS. Diagnosis and treatment of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) associated Staphylococcal pneumonia. *J Antimicrob Agents* 2007; 30: 289-96.
  18. Ryan R, Nick A, Toni H, Laelie AS, Evelyn N, Michael RM, et al. Development of a Triplex Real-Time PCR Assay for detection of Panton-Valentine Leukocidin toxin genes in clinical isolates of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6147-49.
  19. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine Leucocidin genes worldwide emergence. *J Emerg Infect* 2003; 9: 978-84.
  20. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine Leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. *J Lancet* 2002; 359: 753-9.
  21. Azimian A, Fazeli H, Akbrai M. Genetic characterizatio of methicillin Resistant and sensitives Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus strains isolated from different iranian hospital. *ISRN Microbiol* 2012; 50: 3581-5.
  22. VandenBergh MF, Yzerman EP, Vanbelkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-up of Staphylococcus aureus nasal carriage after 8 years redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3133-40.

23. Wang SJ, Chow LW, Wum J. Multiplex PCR for the simultaneous detection of the Sea, Seb, Sec, Sed and See genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. *J Food Drug Anal* 2002; 10:164-9.
24. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (ENT) and Toxic Shock syndrome Toxin-1 gene (TST) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolated harboring these genes. *Arq Inst Biol* 2006;73:165-9.
25. Norouzi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. [The isolation and detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A-E and TSST-1 genes from different sources by PCR method]. *Qom Uni Med Sci J* 2012; 6:78-85. (Persian)
26. Teyhoo M, Mobin H, Mozafari N, Moadab SR, Sedighbayan KH, Monesrast SH. [The prevalence of Toxic Shock Syndrome toxin (TSST-1) producing clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Shohada Hospital in Tabri Iran]. *Med Lab J* 2011; 5: 38-44. (Persian)
27. 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. *Pejouhesh* 2013; 37:62-66. (Persian)
28. Becker K, Roth R, and Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* use of two Multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of *Staphylococcal* enterotoxin genes Exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2548-53.
29. Peck KR, Baek JY, Song JH, Ko KS. Comparison of genotypes and enterotoxin genes between *Staphylococcus aureus* isolates from blood and nasal colonizers in a Korean Hospital. *J Korean Med Scien* 2009;24:585-91.
30. Shukla SK, Karow ME, Brady JM, Stemper ME, Kislow J, Moore N, et al. Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community associated Methicillin susceptible and Methicillin resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3582-92.
31. Kateete DP, Namazzi S, Okee M, Okeng A, Baluku H, Musisi NL, et al. High prevalence of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the surgical units of Mulago Hospital in Kampala Uganda. *BMC Res Notes* 2011;4:326.
32. Alfatemi SMH, Motamedifar M, Hadi N, Saraie HSE. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7: e10741.
33. Mobayen H, Mollaabbaszadeh H, Mirzaei H. [Identification of Pantone Valentine Leukocidin (*pvl*) genes in *Staphylococcus aureus* isolated from In-patients of Emam Reza and Shohada Hospitals of Tabriz by Real-Time PCR]. *Iranian J Med Microbiol* 2013; 6: 72-80. (Persian)
34. Havaei S, Moghadam SO, Pourmand M, Faghri J. Prevalence of genes encoding bi-component Leukocidins among clinical isolates of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iran J Public Health* 2010; 39: 8-14.
35. Moghadam SO, Havaei SA, Pourmand MR. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying pantone-valentine leukocidin gene in cutaneous infections in the city of Isfahan. *J Med Bacteriol* 2012;1: 9-16.



## Identification Sec, Hla, Pvl and Tsst-1 Toxins Genes Profile in of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clinical Isolates

Fathali Z<sup>1</sup>, Mirzaee M<sup>2\*</sup>, Najarpeerayeh S<sup>3</sup>

(Received: October 3, 2015

Accepted: December 5, 2015)

### Abstract

**Introduction:** Staphylococcus aureus produces a wide variety of exotoxins that contribute to its ability to cause disease in hosts. Nearly all strains secrete a group of cytotoxins. The pyrogenic toxin superantigens (PTSAGs) are a group of exotoxins secreted by S. aureus strains. The family of PTSAGs presently includes TSST-1 and most of the staphylococcal enterotoxins. We aimed to study the profile of some virulence genes including: tsst-1, sec, hla and pvl in methicillin-resistant S. aureus by the PCR technique.

**Materials & methods:** A total Of 200 clinical isolates of S. aureus were isolated from patients and identified by conventional diagnostic tests. The MRSA isolates were detected by antibiotic susceptibility tests and mecA. Then, presence of some toxin genes in MRSA isolates was investigated by the Multiplex PCR technique.

**Findings:** The results showed that among the 200 isolates of S. aureus, 95 were confirmed as MRSA by screening with the oxacillin disc diffusion method. Also among the 95 MRSA isolates, all isolates were confirmed as methicillin-resistant by molecular methods. A total of 95 MRSA isolates, the frequency of the tsst-1, sec, hla and pvl genes were 60%, 3.15%, 93.68 and 4.21% respectively. Additionally, 3 (3.15%) isolates were positive for tsst-1, hla and pvl genes.

**Discussion & conclusion:** S. aureus strains that produce toxins such as TSST-1, PVL, HLA, SEC are a serious threat to human health. The higher frequency of some toxin genes in this study may reflect the emergence of isolates containing these genes in Tehran hospitals.

**Keywords:** Staphylococcus aureus, Tsst-1, Sec, Hla, Pvl

1. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Boroujerd Branch, Boroujerd, Iran

2. Dept of Lab Sciences, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University, Boroujerd Branch, Boroujerd, Ira

3. Dept of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*Corresponding author Email: Mirzaei.iaub@gmail.com