Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 4, Oct. – Nov. 2016, Pages: 12-21

Original Article

Cassette Chromosome *mec* Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected from Sina and Imam Reza Hospitals of Tabriz

Peyman Bohlouli[1], Mohammad Reza Nahaei[2]*, Safar Farajnia[3], Mojtaba Varshochi [4], Morteza Ghojazadeh[5], Mohammad Akbari Dibavar[2], Javid Sadeghi[2]

[1]M.Sc. student, International Branch of Aras, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Infectious and Tropical Diseases Research Centre of Tabriz University of Medical Sciences & Department of Microbiology and Laboratory Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[3]Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4]Infectious and Tropical Diseases Research Centre, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[5]Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 15 Nov, 2014 Accepted: 20 Jan, 2015

Abstract

Backgrounds and Objectives: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is a cause of nosocomial infections leading to high mortality. Since these strains have become prevalent in the world, it is necessary to identify and type them.

Materials and Methods: This cross-sectional study was conducted to study a total of 1475 specimens collected from patients of Imam Reza and Sina hospitals of Tabriz in 2012-2013. Using phenotypic tests such as Gram stain, catalase, coagulase, DNase and mannitol fermentation 169 isolates of *Staphylococcus aureus* and by utilizing methicillin-resistance test 100 MRSA isolates were identified. *SCCmec* typing was performed by multiplex PCR method and the results were analyzed using chi-square tests using SPSS-18 software.

Results: Disc agar diffusion test using cefoxitin disc (30 µg) showed methicillin resistance in 59% of our isolates. *mecA* and *femB* genes were identified in all of the MRSA isolates using PCR method. Frequency of *SCCmec* types and sub-types were as follow: *SCCmecIII* (77%), *SCCmecI* (5%), *SCCmecIVa* (1%), *SCCmecIVc* (1%), mixed isolates SCCmecIVc-*III* (1%) and Non typeable isolates (15%). Non typeable isolates recovered in two groups (10% without any band and 5% of multi-bands III-I). In this study, 82% of isolates were HA-MRSA, 3% were CA-MRSA and 15% were Non-typeable.

Conclusion: In our *S. aureus* isolates, the prevalence of methicillin resistance was 59%. The most frequent SCCmec type was *SCCmecIII* (77%). Our results demonstrated the spread of HA-MRSA isolates in the community and propagating CA-MRSA isolates in the studied hospitals.

Keywords: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Cefoxitin, *SCCmec*, Multiplex PCR, *femB* gene, *mecA* gene

* Corresponding Author:
E-mail: nahaeim@yahoo.com

Citation: Bohlouli P, Nahaei M R, Farajnia S, Varshochi M, Ghojazadeh M, Akbari Dibavar M, Sadeghi J. Cassette Chromosome mec Typing of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Isolates Collected from Sina and Imam Reza Hospitals of Tabriz. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2016;38(4):12-21.

مقاله پژوهشی

تعیین تیپ کاست کروموزومی *mec* در ایزوله های های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از بیمارستان های سینا و امام رضا (ع) تبریز

پیمان بهلولی[۱]، محمد رضا نهائی[۲*]، صفر فرج نیا[۳]، مجتبی ورشوچی[۴]، مرتضی قوجازاده[۵]، محمد اکبری دیباور[۲]، جاوید صادقی[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، شعبه بین الملل ارس، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲]مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی وگرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، گروه میکروب شناسی و علوم آزمایشگاهی، تبریز، ایران
[۳]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۴]مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی وگرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۵]مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۳/۸/۲۴ پذیرش: ۹۳/۱۰/۳۰

چکیده

زمینه و اهداف: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از عوامل عفونت بیمارستانی بوده و منجر به مرگ و میر بالایی می‌شود. از آنجایی که این سویه ها در جهان شیوع پیدا کرده اند، لذا شناسایی و تیپ بندی آنها ضروری به نظر می رسد.

مواد و روش ها: این مطالعه تجربی به صورت توصیفی-مقطعی بر روی ۱۴۷۵ نمونه اخذ شده از بیماران در بیمارستانهای امام رضا (ع) و سینای تبریز در سال ۹۲-۱۳۹۱ انجام گردید. با استفاده از تست های فنوتیپی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، DNase و تخمیر مانیتول ۱۶۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* و با آزمون مقاومت به متی سیلین، ۱۰۰ ایزوله MRSA شناسایی شدند. تایپینگ *SCCmec* به روش مولتی پلکس PCR انجام گردید. و نتایج با آزمون کای دو در نرم افزار SPSS-18 آنالیز شد.

نتایج: آزمون دیسک آگار دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین (۳۰ µg) میزان مقاومت به متی سیلین را ۵۹٪ نشان داد. روش PCR در ۱۰۰٪ ایزوله های MRSA ژن *mecA* و *femB* را نشان داد. فراوانی تیپها و ساب تیپهای *SCCmecIII* (۷۷٪)، *SCCmecI* (۵٪)، *SCCmecIVa* (۱٪)، *SCCmecIVc* (۱٪)، سویه ترکیبی *SCCmecIVc-III* (۱٪) و سویه های غیر قابل تیپ بندی (۱۵٪) بدست آمد. سویه های Non typeable (سویه هایی که با روش ما تیپ بندی نشدند) دو نوع بودند (۱۰٪ فاقد باند و ۵٪ دارای مولتی باند I-III بودند). در این مطالعه ۸۲٪ از ایزوله های HA-MRSA (تیپ I و III)، ۳٪ CA-MRSA (تیپ IVa، IVc و ترکیبی IVc-III) و ۱۵٪ Non typeable بودند.

نتیجه گیری: در بین ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه میزان مقاومت به متی سیلین ۵۹٪ بود. غالبترین تیپ *SCCmec* در این مطالعه *SCCmecIII* با میزان ۷۷٪ بود. نتایج حاکی از گسترش سویه های HA-MRSA به جامعه و سویه های CA-MRSA به بیمارستانها می باشد، که این امر نگران کننده است.

کلید واژه ها: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، سفوکسیتین، *SCCmec*، مولتی پلکس PCR، ژن *femB*، ژن *mecA*

* ایمیل نویسنده رابط: nahaeim@yahoo.com

مقدمه

مقاومت میکروارگانیسمها در مقابل عوامل ضد میکروبی یک مشکل درحال رشد و یک چالش جهانی است (۱). مقاومت دارویی باکتریها در بیمارستان‌ها و جامعه از نگرانیهای مهم پزشکان است که به عنوان عامل اصلی شکست درمان بیماران، افزایش بیماری و مرگ و میر می‌باشد. *استافیلوکوکوس اورئوس* از عوامل مهم عفونتهای جدی در بیمارستان و جامعه است. متی سیلین بعنوان اولین پنی سیلین صناعی در سال ۱۹۶۱ برای درمان عفونتهای *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده گردید (۲). اولین

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA: Methicillin Rsistant *Staphylococcus aureus*) در انگلستان در همان سال مورد شناسایی قرار گرفت. عفونتهای ناشی از سویه های MRSA منجر به مرگ و میر بالایی می شوند. این ارگانیسمها توانایی کسب مقاومت به گروه وسیعی از عوامل ضدمیکروبی که تحت عنوان بتالاکتامها از قبیل پنی سیلین، متی سیلین، دیکلوکساسین (دی کلوگزاسیلین)، اگزاسیلین و سفوکسیتین را پیدا نموده‌اند. در طول دهه‌های گذشته میزان عفونت MRSA در جهان در حال افزایش بوده است (۳). در مقایسه با بیماران فاقد عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس*، یک مطالعه در سال ۲۰۰۶ در آمریکا نشان داد بیمارانی که از عفونت MRSA رنج می برند در حدود ۳ برابر زمان بستری شدن و ۳ برابر هزینه های درمانی اضافه را داشته‌اند و میزان مرگ و میر در آنها ۵ برابر بوده است (۴). اخیراً سویه‌های MRSA به دو زیر گروه MRSA های کسب شده از محیط درمانی (Health Care Associated-MRSA) و کسب شده از جامعه (Community Associated-MRSA) تقسیم شده اند. HA-MRSA مشکل عمده در عفونتهای بیمارستانی است و در بیمارانی که بیش از ۴۸ ساعت از زمان بستری شدن آنها سپری شده است دیده می شود. بعنوان مثال بیماران بستری در بیمارستان با یک زخم باز، وجود اجسام خارجی یا افرادی که در شرایط نقص ایمنی قرار دارند در خطر بالاتری از ابتلا به عفونت MRSA می باشند. از سوی دیگر در سالهای اخیر سویه های CA-MRSA بعنوان یک نگرانی عمده بهداشت عمومی در حال افزایش بوده اند. سویه‌های CA-MRSA از بیمارانی که سابقه تماس با تسهیلات مراقبتهای بهداشتی را نداشته اند و سابقه بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان را ندارند جدا می‌گردند (۵). در اواسط دهه ۱۹۹۰ اولین مورد CA-MRSA از استرالیا گزارش گردید و متعاقباً گزارشهایی از کشورهای فرانسه، فنلاند، نیوزیلند و انگلستان صورت گرفت. سویه‌های CA-MRSA در حال تبدیل شدن به شایعترین علت عفونتهای پوستی در میان افراد در خارج از بیمارستان می‌باشند. برخلاف سویه های HA-MRSA این سویه‌ها بیشتر در افراد جوان (کمتر از ۲۰ سال) منجر به ایجاد عفونت می-گردند (۶). وقتی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ستی با سویه‌های MRSA در سطح ژنتیک مولکولی مقایسه می گردند، سویه‌های MRSA حاوی قطعات DNA کروموزومی متحرک اضافی بنام (*SCCmec*: Staphylococcal Casset Chromosome *mec*) یا جزایر ژنومی *SCCmec* می باشند. *SCCmec* حاوی ژنهای کد کنندهٔ پروتئین باند شونده به پنی سیلین (PBP_{2a} یا PBP_2)، ژنهای تنظیمی *mecI* و $mecR_1$ می باشد(۷). ژن مقاومت *mecA* و ترادف تنظیمی PBP_{2a} با میل ترکیبی پایین را کد می‌کنند که در سویه‌های حساس به متی سیلین وجود ندارد. این پروتئین امکان بقاء برای باکتری در غلظتهای کشنده از آنتی بیوتیک بتالاکتام را ممکن می‌سازد. در محیطهای بالینی با فشار بالای آنتی بیوتیک ها، سویه های HA-MRSA در مقایسه با CA-MRSA به طیف بالاتر مقاومت ضدمیکروبی متمایل می گردند (۸). تا کنون پنج تیپ و چهار ساب تیپ شایع *SCCmec* براساس ترکیب کمپلکس *mec* متمایز شده‌اند (۹) که دارای اندازه های متفاوتی بین ۲۰٫۹ تا ۶۶٫۹ کیلوباز می باشند. *SCCmecI* (۳۴٫۳ کیلو باز)، *SCCmecII* (۵۳ کیلو باز)،*SCCmecIII* (۶۶٫۹ کیلو باز)، *SCCmecIV* (۲۰٫۹ تا ۲۴٫۳ کیلو باز) و *SCCmecV* (۲۸ کیلو باز) می باشند. تیپهای I، II و III به نام سویه های مرتبط با بیمارستان (HA-MRSA)، تیپها و ساب تیپهای IV و V به نام سویه های مرتبط با جامعه (CA-MRSA) نامیده می شوند (۶). تیپهای I، IV و V فقط به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام مقاومند در حالیکه تیپهای II و III با مقاومتهای چند دارویی همراه هستند. سویه های CA-MRSA در مقایسه با HA-MRSA دارای قابلیت بیشتری در تولید توکسین پنتون والنتین لکوسیدین (PVL) می باشند. شیوع توکسین PVL در سویه های CA-MRSA در کشورها و مطالعات مختلف متفاوت بوده است. این رقم در آمریکا ۷۷٪ و در اروپای شرقی ۵٪ بوده است. پنومونی مرتبط با تولید PVL توسط سویه های CA-MRSA با نسبت مورتالیتی ۳۷٪ در ظرف ۴۸ ساعت و در بعضی از مطالعات با مورتالیتی ۷۵٪ گزارش شده است (۱۰). از نگرانی‌های فعلی افزایش MRSA کسب شده از جامعه و نیز افزایش تعداد عفونت‌های MRSA کسب شده از بیمارستان‌ها می‌باشد. تایپینگ *SCCmec* به روش مولتی پلکس PCR علاوه بر افتراق سویه های مرتبط با جامعه و بیمارستان به عنوان یک روش مفید در نظارت بر سویه های با مقاومت چند دارویی HA-MRSA و سویه‌های ویرولان CA-MRSA بکار رفته است (۹). با توجه به اهمیت سویه‌های HA-MRSA و CA-MRSA و نگرانی از گسترش متقاطع این ارگانیسمها به جامعه و بیمارستان تیپ بندی کاست کروموزومی جهت درک بهتر اپیدمیولوژی MRSA در این منطقه از کشور انجام گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی به صورت توصیفی – مقطعی در محدوده زمانی فروردین ۱۳۹۱ تا فروردین ماه ۱۳۹۲ در آزمایشگاه باکتریولوژی مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری تبریز و زیر نظر دانشگاه بین الملل ارس دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل بیماران سرپایی مراجعه کننده به اورژانس، دیالیز و بیمارانی که به بخشهای بیمارستانی مراجعه می-کردند و بستری (بیماران بستری در ICU، جراحی، عفونی، سوختگی و غیره که از زمان پذیرش آنها بیش از ۴۸ ساعت سپری شده بود) در بیمارستان های امام رضا (ع) و سینای تبریز بودند. در مجموع ۱۴۷۵ نمونه از بیماران اخذ گردید. نمونه ها به محیط کشت نوترینت براث (Merck) تلقیح شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. سپس کلنی ها از نظر گرم مثبت بودن، تولید کاتالاز، کواگولاز، همولیزین، DNase ، مقاومت نسبت به باستیراسین (۰/۴ U) و سفوکسیتین (۳۰) µg (Mast diagnostic, UK) مورد بررسی قرار گرفتند تا ایزوله های MRSA شناسایی گردند (۱۱). این ایزوله ها متعاقباً از نظر ژنهای *femB* (ژن تعیین هویت استافیلوکوکوس اورئوس) و

mecA (ژن مقاومت به متی‌سیلین) با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲و۱۳) تا از نظر مولکولی نیز تایید گردند. نهایتاً ۶۹ ایزوله MSSA و ۱۰۰ ایزوله MRSA از همدیگر مجزا گردیدند. برای شناسایی مقاومت به متی سیلین از روش دیسک آگار دیفیوژن مطابق دستور العمل CLSI (۲۰۱۱)، از محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک سفوکسیتین (۳۰ µg) در دمای ۳۵°C و به مدت ۱۸ ساعت استفاده شد. از سویه های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 بعنوان کنترل منفی (حساس به متی‌سیلین) و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 بعنوان کنترل مثبت (مقاوم به متی سیلین) استفاده شد (۱۴). برای استخراج DNA از روش CTAB استفاده شد (۱۵). برای تعیین وجود و یا عدم وجود ژنهای *mecA* و *femB*، تیپها و ساب تایپهای مختلف *SCCmecI* تا *SCCmecV* و *SCCmecIVa* تا *SCCmecIVd* از یک روش مولتی پلکس PCR واحد استفاده شد(۹). برای انجام مولتی پلکس PCR از کیت Qiagen استفاده شد. ترکیب واکنش شامل ۲۵ µl مسترمیکس (حاوی Taq پلی مراز، $MgCl_2$ و dNTP)، ۵ µl پرایمر میکس (Sigma Aldrich) با غلظت ۲ µM از هر پرایمر(جدول ۱)، ۸ µl (۱۸-۱۶و۹)

آب RNase-free، ۱۰ µl محلول Q-solution و ۲ µl از Template DNA استفاده شد. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون در ۹۴°C بمدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در ۵۵°C بمدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن زنجیره در ۷۲°C بمدت ۱ دقیقه و بالاخره طویل شدن نهایی در ۷۲°C بمدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf) انجام شد. الکتروفورز محصول PCR در ژل ۱/۸ درصد آگارز بمدت ۷۵ دقیقه در ۹۰ ولت صورت گرفت و رنگ آمیزی ژل یا اتیدیم بروماید انجام و با دستگاه ژل داکیومنت (Biodoc-It) مورد بررسی قرار گرفت. از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 بعنوان کنترل منفی (حساس به متی سیلین)، NCTC 10442 (*SCCmecI*)، N315 (*SCCmecII*)، 2082۸۵/ (*SCCmecIII*)، JCSC 4744 (*SCCmecIVa*) استفاده شد (۹). از مارکر DNA (۱۰۰ bp و ۱ kb) برای تعیین وزن مولکولی در مطالعه استفاده شد. داده های بدست آمده با استفاده از روشهای آماری توصیفی (فراوانی – درصد و Mean±SD) و با استفاده از آزمون Chi-square و Fishers Exact test در نرم افزار آماری SPSS-18 صورت گرفت.

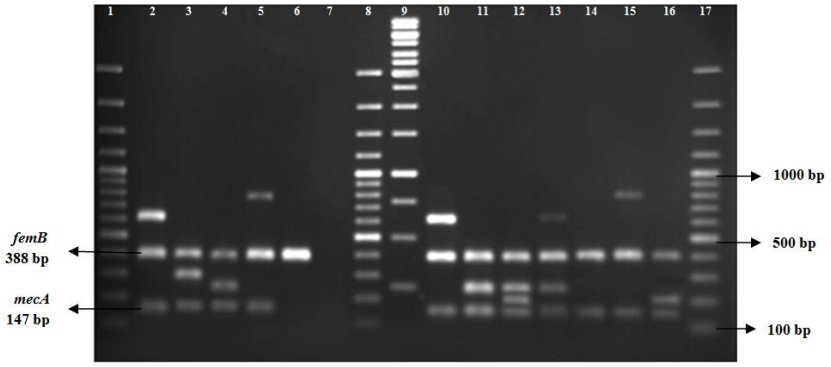
یافته ها

از بین بیماران مورد مطالعه ۶۷٪ مرد و ۳۳٪ زن بودند. از نظر سنی بیماران دارای حداقل ۲ سال و حداکثر ۸۸ سال سن داشتند. میانگین سن بیماران ۲۲/۳±۵۶/۹ سال بود. حداقل و حداکثر زمان بستری شدن به ترتیب ۱ روز و ۸۱ روز بود. میانگین بستری این بیماران ۶ روز بود. از بین ۱۴۷۵ نمونه بالینی ۱۶۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جمع آوری شد، که ۱۰۰ ایزوله آن MRSA بود. بیشترین میزان جداسازی MRSA مربوط به نمونه بینی (۲۴٪) بود. در بین بخشهای بیمارستانی، بخش ICU (۳۰٪) بیشترین و ENT (صفر درصد) کمترین میزان شیوع MRSA را به خود اختصاص داد (P= ۰/۰۱۲) میزان مقاومت به متی سیلین با دیسک سفوکسیتین ۵۹٪ بدست آمد. با روش PCR جهت شناسایی ژن *mecA* (استاندار طلائی) میزان مقاومت به متی سیلین ۵۹٪ تعیین شد. روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین در مقایسه با PCR دارای ۱۰۰٪ حساسیت و ۱۰۰٪ ویژگی بود. آزمون فیشر ارتباط معنی داری را بین روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن آگار و روش PCR برای ژن *mecA* نشان داد (P= ۰/۰۰۱).

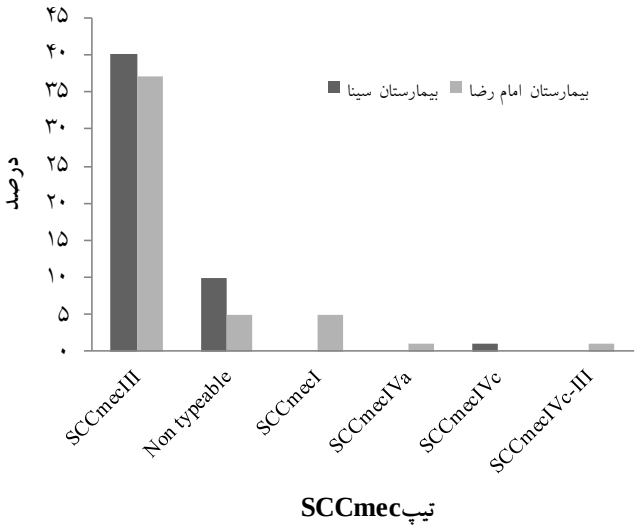
جدول ۱: پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه

پرایمرها	ترادف اولیگونوکلئوتیدی (5´-3´)	اندازه	ویژگی	منابع
Type I-F Type I–R	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	۶۱۳bp	*SCCmecI*	۹
Type II-F Type II-R	GATTACTTCAGAACCAGGTCAT TAAACTGTGTCACACGATCCAT	۲۸۷ bp	*SCCmecII*	۱۶
Type III-F Type III-R	CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	۲۴۳ bp	*SCCmecIII*	۱۷
Type IVa –F Type Iva– R	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	۷۷۶ bp	*SCCmecIVa*	۹
Type IVb-F Type IVb-R	TCTGGAATTACTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	۴۹۳ bp	*SCCmecIVb*	۹
Type IVc-F Type IVc-R	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	۲۰۰ bp	*SCCmecIVc*	۹
Type IVd-F Type IVd-R	CTCAAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	۸۸۱ bp	*SCCmec IVd*	۹
Type V-F Type V-R	ACCTACAGCCATTGCATTATG TGTATACATTTCGCCACTAGCT	۱۱۵۹bp	*SCCmecV*	۱۶
mecA-F *mecA*-R	GTGAAGATATACCAAGTGATT ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	۱۴۷ bp	*mecA*	۹
femB-F *femB*-R	CGTGAGAATGATGGCTTTGA TTAATACGCCCATCCATCGT	۳۸۸ bp	*femB*	۱۸

در این مطالعه ۱۰۰٪ ایزوله های MRSA دارای ژن *femB* و *mecA* بودند (شکل ۱). بیشترین تیپ شناسایی شده *SCCmecIII* بود (۷۷٪). فراوانی تیپها و ساب تیپهای مختلف *SCCmec* به صورت مجزا در دو بیمارستان در نمودار ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه سویه های Non typable شامل دو گروه بود: (۱) ایزوله های فاقد باند که ۱۰٪ ایزوله ها را شامل بودند و (۲) ایزوله مولتی باند که دارای دو باند (تیپ I و III) بودند و ۵٪ کل ایزوله‌ها را به خود اختصاص دادند. در این پژوهش ۱ مورد ایزوله ترکیبی *SCCmecIVc-III* مورد شناسایی قرار گرفت و مطابق دستورالعمل کمیته بین المللی *SCCmec* (IWG-SCC) در گروه *SCCmecIV* طبقه‌بندی شد. بیشترین تیپ غالب در هر دو بیمارستان سینا و امام رضا (ع) از نوع *SCCmecIII* بود. در مطالعه ما ۸۲٪ ایزوله های MRSA مرتبط با بیمارستان بودند، ۳٪ از ایزوله ها مرتبط با جامعه و ۱۵٪ غیر قابل تیپ بندی بودند. در مطالعه ما ۱۰۰٪ (۳/۳) ایزوله‌های CA-MRSA از بیماران بستری بدست آمد. در این مطالعه ۷ ایزوله MRSA از بیماران سرپایی جدا شده بود و ۱۰۰٪ این ایزوله ها از نوع HA-MRSA بودند. در مطالعه ما MRSA های با تیپ *SCCmecIII* از بیشتر نمونه های بالینی ایزوله شدند (نمودار ۱). این ایزوله ها خصوصا در نمونه های جدا شده از تراشه، مجاری تنفسی (گلو و بینی) و زخم از شیوع بالایی برخوردار بودند(P= ۰/۰۰۱) به طوریکه ۹۲٪ (۱۱/۱۲) از نمونه های مربوط به تراشه، ۷۷٪ (۱۷/۲۲) از نمونه های گلو، ۷۶٪ (۱۹/۲۵) نمونه های بینی و ۶۱٪ (۱۱/۱۸) از نمونه‌های زخم مربوط به ایزوله‌های MRSA با تیپ *SCCmecIII* بودند. در بین بخشهای بیمارستانی، بیشترین میزان جداسازی MRSA با تیپ *SCCmecIII* مربوط به بخش ICU (۳۴٪) و کمترین میزان (صفر درصد) مربوط به بخشهای ENT و پوست بود (P= ۰/۰۰۲).



شکل ۱: نتایج آمپلی فیکاسیون توام ۱۰ ژن در مولتی پلکس PCR واحد برای سویه های استاندارد و ایزوله های بالینی.
Lane 1، Lane 8 و Lane 17 سایز مارکر ۱۰۰bp؛ Lane 9 سایز مارکر kp۱؛ Lane 2 تا Lane 6 به ترتیب سویه های استاندارد *SCCmec* تیپ I (NCTC 10442)، II (N315)، III (۲۰۸۲۸۵)، IVa (JCSC 4744) و ATCC 29213 (کنترل مثبت ژن *femB* و کنترل منفی برای ژنهای *mecA* و *SCCmec*)؛ Lane 7 کنترل منفی (آب مقطر)؛ Lane 10 تا Lane 16 به ترتیب ایزوله های بالینی (۵۷، ۶، ۱۴۵، ۱۳۷، ۱، ۹۳ و ۱۶۸) *SCCmec* تیپ I، III، ترکیبی (III-IVc)، Non typeable از نوع مولتی باند (I-III)، Non typeable از نوع فاقد باند برای *SCCmec*، تیپ IVa و IVc.



نمودار ۱: تعداد تیپها و ساب تیپهای مختلف *SCCmec* در MRSA های مورد مطالعه

بحث

امروزه به دلیل استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها با افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی مواجه هستیم. در ایران نیز انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتریهای بیماریزا به عنوان چالش مهم برای جامعه پزشکی در درمان بیماریهای عفونی مطرح شده است (۲۲). بر اساس توصیه CLSI (2011) از تست حساسیت نسب به اگزاسیلین و سفوکسیتین می توان برای تایید مقاومت به متی سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده نمود (۱۴). در این تحقیق میزان مقاومت به متی سیلین با استفاده از متد دیسک دیفیوژن اگار با دیسک سفوکسیتین (۳۰ µg)، ۵۹ درصد نشان داده شد. با استفاده از روش PCR، ۵۹ درصد از سویه‌ها دارای ژن *mecA* بودند. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر میزان بالایی از مقاومت نسبت به متی سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد و روش دیسک آگار دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین در شناسایی مقاومت به متی سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ۱۰۰ درصد حساسیت و ۱۰۰ درصد ویژگی در مقایسه با PCR بود. در دو مطالعه مجزا که توسط Rao Venkatakrishna (۲۰۰۹) و Sangeetha (۲۰۱۲) انجام شده بود میزان حساسیت و ویژگی روش دیسک سفوکسیتین در مقایسه با PCR ۱۰۰٪ گزارش شده بود (۲۰و۲۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* از عوامل مهم عفونتهای شدید در بیمارستان و جامعه است و عفونت های ناشی از سویه های مقاوم به متی سیلین این باکتری (MRSA) منجر به مرگ و میر بالایی می شوند و شیوع آنها در جوامع مختلف از کمتر از ۱٪ در نروژ و سوئد، ۵ تا ۵۰٪ در آمریکا (۱)، ۵۰٪ در ایران و بیش از ۸۰٪ در هند بوده است (۱۹).

اولین سویه MRSA (*SCCmecI*) در سال ۱۹۶۰ از انگستان گزارش شد. در سال ۱۹۸۲ MRSA (*SCCmecII*) از ژاپن گزارش گردید و چند سال بعد در سال ۱۹۸۵ MRSA (*SCCmecIII*) از زلاندنو گزارش گردید. با آغاز دهه ۹۰ چندین سویه MRSA که حاوی تیپ *SCCmecIV* بودند گسترش یافتند. در سال ۲۰۰۴ سویه های تیپ *SCCmecV* در استرالیا مشاهده گردید و بالاخره سویه های تیپ *SCCmecVI* و *SCCmecVII* به ترتیب از پرتغال و تایوان گزارش شدند (۹).

نتایج مطالعه ما نشان داد از مجموع ۱۰۰ ایزوله MRSA جدا شده، ۸۲٪ از نوع HA-MRSA (تیپ I و III) و ۳٪ از نوع CA-MRSA (تیپهای IVa، IVc و تیپ ترکیبی III-IVc) بودند و ۱۵٪ از ایزوله‌ها قابلیت تایپینگ را نداشتند. بررسی تیپهای CA-MRSA بر اساس زمان بستری شدن بیمار نشان داد که هر سه ایزوله کسب شده از محیط بیمارستان می باشند. علت بالا بودن ایزوله‌های بیمارستانی HA-MRSA در مطالعه ما ممکن است به دلایل زیر باشد:

۱) تعداد بیماران بستری در مقایسه با سرپایی بیشتر بود؛

۲) کلونهای MRSA ممکن است در مناطق جغرافیایی متفاوت و حتی بیمارستان های مختلف متفاوت باشند؛

۳) استفاده بی رویه از آنتی بیوتیکها در جامعه و بیمارستان ممکن است کلون های حساس را از بین برده و سبب ظهور کلون هایی گردد که تحت فشار آنتی بیوتیکی بالا بوده اند.

در مطالعه ما ۷۶٪ از بیماران بستری و ۲۴٪ سرپایی بودند. ۹۰٪ MRSA ها از بیماران بستری و ۱۰٪ از بیماران سرپایی جداسازی شده بودند. بیشترین تیپ شناسایی شده در هر دو بیمارستان *SCCmecIII* بود (نمودار ۱). با توجه به بالا بودن ایزوله های HA-MRSA در مطالعه ما مقاومت بالاتری نیز نسبت به مطالعات دیگر می توان انتظار داشت.

ایزوله های HA-MRSA باعث دو چندان شدن مشکلات درمانی بخصوص در بخش های بیمارستان می شوند (۶). در مطالعات انجام شده در شهرستان فسا (سال ۱۳۸۹) تیپ های II (۴۴٪)، III (۳۷٪) ، I (۷/۵٪)، V (۷/۵٪) و IV (۴٪) گزارش شده بود(۲۲). در مطالعه انجام شده در شیراز در سال ۱۳۸۷ تیپ III (۷۴/۳٪)، IVa (۸/۵٪)، IVc (۴/۵٪)، IVd و V (۲/۶٪) و تیپ II (۰/۶٪) گزارش شده است (۲۳). در مطالعه انجام شده در سال ۱۳۸۸ در کاشان تیپهای I (۳/۴٪)، II (۱۳/۸٪) ، IVb (۹/۲٪)، IVd (۴/۶٪)، V(۳/۴٪) و ۵۸/۶٪ از سویه‌ها Non typable بودند و هیچ موردی از تیپ III گزارش نشده بود (۶). در مطالعه انجام شده در سال ۱۳۹۱ در کرمان تیپهای III (۴۸/۳٪)، V(۱۹/۱٪)، I (۱۶/۸۵٪) و IV (۳/۳٪) گزارش شده بود (۲۴). همانطور که مشاهده می‌شود سویه های تیپ III در حال افزایش هستند. در کشورهای آسیایی همچون مالزی نیز تیپ III (۹۲٪) شایع می‌باشد (۲۵). یک مطالعه اپیدمیولوژی در ۱۱ کشور آسیایی، نشان داد که تیپ III در آن کشورها غالب بوده است (۲۶). برخلاف مطالعه ما، در یک مطالعه در سال ۱۳۸۸ در کاشان هیچ موردی از تیپ III شناسایی نشده بود (۶). علت این مسئله می تواند به دلایل زیر بوده باشد.

۱) روش مطالعه: در مطالعه انجام شده در کاشان از مجموعه پرایمرهای Zhang برای تایپینگ *SCCmec* استفاده شده بود که پرایمر تیپ III آن مطالعه ناحیه *Orfc* Z049 را هدفگیری می‌نمایند درحالیکه درمطالعه ما از پرایمر Milherico برای تیپ III استفاده شده بود که اختصاصی برای ناحیه j_1 می‌باشد (۶و۹).

۲) اپیدمیولوژی MRSA: حضور کلون های مختلف MRSA در مناطق و یا حتی در بیمارستان های مختلف متفاوت می باشد.

۳) روند زمانی: شیوع کلونهای مختلف MRSA ممکن است با گذشت زمان تغییر کند. روش هایی برای تیپ بندی عناصر *SCCmec* در سال های اخیر بر اساس متد مولتی پلکس PCR بوسیله Oliveira، Lencastre، Hiramatsu، Boye، Zhang، Kondo ، Milheirico و.... توسعه یافته است (۲۵). این روش ها متمرکز بر ۲ متد متفاوت بوده اند (۱) تجزیه و تحلیل ناحیه j و (۲) کلاس اصلی *mec* و تیپ *ccr*.

Zhang در سال ۲۰۰۵ یک روش برای شناسایی تیپ های I تا V و ساب تیپ های IVa تا IVd در یک واکنش مولتی پلکس PCR که دارای یک باند اختصاصی برای هر تیپ بود ارائه نمود. این روش همچنین قادر بود به طور همزمان سویه های MRSA را از MSSA متمایز نماید (۹). روش Zhang برای آنالیز با مقیاس وسیع

مفید نیست ولی قادر به شناسایی *SCCmecV* تایوانی را که دارای یک باند اضافی در ۱۵۹۹ (bp) در مقایسه با تیپ V رفرانس می-باشد می دهد (۲۵). پیچیده ترین سیستم توسط Kondo و همکاران در سال ۲۰۰۷ ارائه گردیده است که ترکیبی از ۶ واکنش مولتی پلکس PCR می باشد. این روش انعطاف پذیر بوده و قادر است تیپ‌های I تا IX را شناسایی نماید اما تیپ VII و X را شناسایی نمی‌نماید. از طرفی بسیاری از ساب تیپ های *SCCmec* نیز شناسایی می گردند، ولی از آنجایی که این روش نیازمند تعداد نسبتا زیادی از واکنش های PCR می باشد لذا پیچیده بوده و از نظر زمانی وقت گیر می باشد (۲۵). با توجه به تعداد رو به رشد کلون های MRSA حمل کننده ساب تیپ های *SCCmecIV*، یکی از مهمترین مسئله ابداع یک روش برای ساب تایپینگ *SCCmecIV* می باشد. روش Milherico قادر به شناسایی ساب تیپ های IVa تا IVh می باشد (۲۶). بیشتر متدهایی که اخیرا ابداع شده اند قادرند علاوه بر تایپینگ ، بطور همزمان سویه های MRSA را از MSSA متمایز نماید (۹و۲۳). همانطور که پیشتر اشاره شد در مطالعه ما نیز یک مورد سویه ترکیبی *SCCmecIVc-III* مورد شناسایی قرار گرفت، که در آن*SCCmecIII* در کنار *SCCmecIVc* حضور داشت (شکل ۱). در پنج مورد نیز تیپ I همراه با تیپ III (مولتی باند) بود. ما برای استفاده بهینه از مولتی پلکس PCR برای تایپینگ *SCCmec* جهت تیپ بندی *SCCmecI* از پرایمرهای Zhang (اختصاص برای E008 از *orf*)، *SCCmecII* از پرایمرهای Kondo و همکاران (اختصاصی برای ناحیه kdp)، *SCCmecIII* از پرایمرهای Milherico (اختصاصی برای ناحیه j_1) ، ساب تایپ های *SCCmecIVa* تا *SCCmecIVd* از پرایمرهای Zhang (به ترتیب اختصاصی برای *orf* های نواحی CQ002، CM001، CR002 و CG001) و برای *SCCmecV* از پرایمرهای Kondo (اختصاصی برای V024) استفاده نمودیم (جدول ۱). روش ما از لحاظ استفاده از پرایمرهای مربوط به تیپها و ساب تیپهای I، II، III و IVa همانند متد Ghaznavi-Rad E می باشد ولی از لحاظ اینکه در آن مطالعه از مجموعه دیگری از پرایمرها برای ساب تایپ های *SCCmecIVb* (پرایمرهای Okoma)، *SCCmecIVc* (پرایمرهای Ma et) ، *SCCmecIVd* (پرایمرهای Kondo) و تیپ *SCCmecV* (پرایمرهای Zhang) استفاده شده بود تفاوت دارد (۲۹). تغییر در پرایمرها در مطالعه ما به دلایل زیر می باشد:

۱) ما برای جلوگیری از تداخل باندهای مجموعه *SCCmec* با ژنهای *femB* و*mecA* مجبور به اعمال تغییراتی در نوع پرایمر ها بودیم.

۲) پرایمر های Milherico نسبت به Zhang در شناسایی تیپ III در موقع Blast (Pubmed) اختصاصی تر بودند.

در مطالعه ما تیپ II، IVb، IVd و V مورد شناسایی قرار نگرفت ولی متد ما از دقت و حساسیت کافی در شناسایی سویه های استاندارد *SCCmecI*، *SCCmecII*، *SCCmecIII* و *SCCmecIVa* برخوردار بود و علاوه بر این ۱ مورد سویه *SCCmecIVc* را نیز مورد شناسایی قرار داد که به علت نبود سویه استاندارد جهت سکانسینگ ارسال گردید و نهایتا مورد تایید قرار گرفت. در متد ما به علت عدم شناسایی ساب تایپ های IVb، IVd و تیپ V و نبود سویه های استاندارد مربوط به این سویه ها، معتبر بودن این روش برای شناسایی تیپهای فوق نامعلوم می باشد. ولی متد ما قادر به شناسایی همزمان ژن *mecA* جهت افتراق MRSA از MSSA و ژن تعیین هویت *استافیلوکوکوس اورئوس* (*femB*) در مجاورت تیپ بندی کاست کروموزمی (*SCCmec*) می باشد. همانطور که پیشتر ذکر گردید در مطالعه ما سویه های HA-MRSA از شیوع بسیار بالایی (۸۲٪) برخوردار بودند. این سویه ها معمولا مقاومت دارویی بالایی داشته و مشکلات درمانی زیادی را برای بیماران بوجود می آوردند. اولین ایزوله HA-MRSA در سال ۱۹۶۱ از انگستان گزارش شد که این امر دقیقا ۲ سال بعد از بکارگیری متی-سیلین در مراکز درمانی بود. در سالهای بعد سویه های MRSA به دیگر کشورهای اروپایی گسترش یافته و در دهه ۱۹۷۰ ، MRSA گسترش جهانی پیدا نمود و عامل اکثریت عفونتهای بیمارستانی در استرالیا، ژاپن و آمریکا گردید (۲۷). شیوع MRSA در کشور های اروپایی متغیر بوده و دامنه آن از ۱٪ در کشورهای شمالی تا ۴۵٪ در کشورهای جنوبی متغیر است (۶). در مطالعه انجام شده در تبریز در سال ۱۳۸۵ میزان مقاومت به متی سیلین ۳۸٪ بود که هم اکنون با در نظر گرفتن مطالعه ما این میزان به ۵۹٪ (۱۳۹۱) افزایش یافته است (۲۸). در بیمارستان های مالزی دامنه شیوع MRSA از ۵/۶٪ به ۳۳/۷٪ با نسبت کلی ۲۶٪ (وزارت بهداشت مالزی) رسیده است. بیشتر HA-MRSA در مالزی متعلق به ST239 III/IIIA می باشد و اپیدمیولوژیک MRSA (*SCCmecIVh*) سویه های در حال ظهور بوده و سویه های *SCCmecV* (ST188) در حال شناسایی شدن می باشند(۲۵). شایعترین تیپ مشاهده شده در مطالعه ما *SCCmecIII* (۷۷٪) بود. در مطالعه انجام شده در مالزی ۹۳٪ سویه ها *SCCmecIII* بودند (۲۵). در یک مطالعه اپیدمیولوژی که به بررسی *SCCmec* در کشورهای آسیایی پرداخته است بیشترین تیپ شناسایی شده در کشورهای تایلند، سری لانکا، اندونزی، ویتنام، فیلیپین، عربستان سعودی، هند و سنگاپور از نوع *SCCmecIII* بودند در حالیکه در کشور ژاپن و کره جنوبی تیپ غالب *SCCmecII* بود (۲۹). دومین تیپ شایع در مطالعه ما تیپ I بود (۵٪)، در حالیکه در مطالعه دیگری که در مالزی انجام شده بود تیپ I ، ۲۲/۵٪ بود (۶). در مقابل در مطالعه انجام شده در آفریقای جنوبی هیچ موردی از تیپ I گزارش نشده است (۳۰). در مطالعه انجام شده در شیراز ۷/۷٪ از سویه ها تیپ I بودند که با مطالعه ما همخوانی دارد (۲۲). در مطالعه ما تیپ IVc و تیپ IVa هر کدام به میزان ۱٪ شناسایی شدند. در مطالعه انجام شده در آفریقای جنوبی میزان شیوع تیپ IVc ۱٪ بود و تیپ IVa نیز مورد شناسایی قرار نگرفته بود(۳۱). در مطالعه انجام شده در کاشان تیپ IVa و IVc به ترتیب ۵/۱٪ و ۴/۵٪ شناسایی شده بود (۲۳). در مطالعه ما ۱۵٪ از ایزوله ها قابلیت تایپینگ را نداشتند ولی این ایزوله ها دارای ژن *mecA* و *femB* بودند (شکل ۱ و نمودار ۱). این ایزوله ها در دوگروه قرار گرفتند:

۱) ایزوله هایی که فاقد باند برای *SCCmec* بودند (۱۰٪ کل ایزوله ها)

۲) ایزوله های مولتی باند که هم تیپ I و تیپ III را داشتند (۵٪ کل سویه ها).

معلوم نیست در محیط بیمارستان سویه هایی از تیپ *SCCmecI* قادر به ادغام کل کاست کروموزومی تیپ III یا بخشی از این کاست (Tn554 یا ψTN554) به داخل کروموزوم خود که منجر به ظهور سویه های مولتی باند I و III شود می باشند یا نه؟ در تعدادی از مطالعات اشاره شده است که کاست کروموزومی ممکن است به علت استرسهای وارد شده (عوامل فیزیکی و شیمیایی) ناپایدار شود (۱۰). ما نیز از تاثیر این عوامل بر سویه‌های مولتی باند *SCCmecIII-I* آگاهی نداریم. اینکه سویه های مولتی باند *SCCmecIII-I* در اثر استرسهای وارد شده قادر به ایجاد دو تیپ متفاوت *SCCmec* (I و III) با یک جد مشترک در نسلهای بعدی شود نامعلوم است و نیازمند مطالعه بیشتر می باشد. لازم به ذکر است که سویه مولتی باندی که دارای هم تیپ IVc و هم تیپ III بود به میزان ۱٪ مورد شناسایی قرار گرفت (*SCCmecIVc-III*). این سویه بنا به دستور العمل IWG-SCC به عنوان سویه ترکیبی در گروه *SCCmecIV* قرار گرفت (۳۱). در مطالعه انجام شده در افریقای جنوبی ۸٪ سویه ها فاقد باند بودند و ۱٪ سویه ها نیز مولتی باند III و IVc را داشتند و در کشور بلژیک نیز ۴٪ سویه ها فاقد باند بودند (۳۰). اما مطالعه‌ای که در آن مولتی باند I و III شناسایی شده باشد پیدا نکردیم. در مطالعه ما سویه‌های CA-MRSA از شیوع کمی برخوردار بودند و همه آنها کسب شده از محیط بیمارستان بودند. این نتایج نشان می‌دهد سویه های CA-MRSA در بیمارستان های سینا و امام رضا (ع) تبریز به وضعیت اپیدمیک تبدیل نشده اند و این مسئله امیدوار کننده می باشد. اولین گزارش CA-MRSA در سال ۱۹۹۳ از استرالیای غربی بود ولی در دهه های گذشته CA-MRSA بطور جهانی ظهور یافته اند (۶). در مطالعه ما سویه های Non typeable به احتمال زیاد مربوط به تیپ های جدید و یا بازآرایی ساختاری و نوترکیبی در عنصر *SCCmec* می باشند (۹و۲۵). از طرف دیگر در مطالعات انجام شده در نقاط مختلف کشور شیوع CA-MRSA متفاوت بوده است. بعنوان مثال در مطالعات انجام شده در تهران میزان شیوع CA-MRSA ۵۸/۵٪ گزارش شده است (۳۲) و در مطالعه دیگر در کاشان ۶۱٪ سویه ها CA-MRSA گزارش شده اند. در حالیکه در مطالعه انجام شده در قزوین ۰/۵٪ سویه ها CA-MRSA بودند (۶). در مطالعه انجام شده در آمریکا میزان شیوع CA-MRSA ۳۳٪ گزارش شده است (۳۳). در بررسی انجام شده در کشور آفریقای جنوبی ۷٪ سویه ها CA-MRSA بودند سویه های CA-MRSA در درجه اول بعنوان عفونت های پوست و بافت نرم آشکار شدند لیکن این سویه ها قادرند تعداد زیادی از بیماری های تهاجمی تهدید کننده حیات همچون، پنومونی نکروزان و فاشیت نکروزان را ایجاد نمایند. لازم به ذکر است که افراد مذکور فاقد ریسک فاکتورهایی دال بر کسب عفونت MRSA بودند (۱۰و۳۱).

در آمریکا سویه های MRSA مرتبط با جامعه (CA-MRSA) که به آنها USA300 گفته می شود به عوامل بتالاکتام و اریتروماسین مقاوم بوده، کد کننده PVL می باشند و *SCCmecIV* را حمل می کنند (۳۴). کلون های CA-MRSA مشاهده شده در کشورهایی نظیر دانمارک، نروژ و هلند نیز سویه USA300 می باشند. در سال های اخیر بخصوص در آمریکا و تایوان CA-MRSA جایگزین HA-MRSA (USA300) در مراکز درمانی شده است (۶). با توجه به نفوذ USA300 به محیط درمانی، طرح تفکیک MRSA بر اساس منشا جامعه یا محیط درمانی ممکن است منسوخ شود (۳۱). در مطالعه ما تمامی سویه‌های MRSA جدا شده از بیماران سرپایی از نوع HA-MRSA بودند. لذا به نظر می‌رسد سویه‌های HA-MRSA در شهر تبریز به جامعه و سویه های CA-MRSA به بیمارستانها گسترش یافته‌اند. چنین وضعیتی نگران کننده بوده و نیاز به چاره اندیشی دارد (۱۰).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق مشخص می‌شود روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن (۳۰ µg) در شناسایی سویه‌های MRSA در مقایسه با PCR دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ می‌باشد. نتایج این مطالعه موید مقاومت بالا نسبت به متی سیلین در بین ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بود بطوری که این مقاومت از ۳۸٪ در سال ۱۳۸۵ به ۵۹٪ در سال ۱۳۹۳ (۲۱ ٪ افزایش) رسیده است. بیشترین تیپ غالب در این مطالعه *SCCmecIII* با میزان ۷۷٪ بود. نتایج تایپینگ *SCCmec* و بررسی زمان پذیرش بیماران (سرپایی و بستری) در مطالعه ما نشان داد که سویه‌های HA-MRSA به جامعه و سویه‌های CA-MRSA به بیمارستانها گسترش یافته‌اند، که این امر برای سیستمهای مراقبتهای بهداشتی و درمانی نگران کننده می باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی مصوب مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد ۰۲-۹۱ و منتج از پایاننامه کارشناسی ارشد آقای پیمان بهلولی می‌باشد. از حمایت های مالی مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری و دانشگاه بین الملل ارس تقدیر و تشکر به عمل می آید.

References

1. Johnston BL, Bryce E. Hospital infection control strategies for vancomycin resistant enterococcus, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficult*. *Can Med Assoc J* 2009; **180**(6): 627-631.
2. Sakon J, Liao HH, Kanikula AM, Benning MM, Rayment I, Holden HM, et al. Molecular structure of kanamycin nucleotidyltransferase determined to 3.0-A resolution. *Biochemistry* 1993; **32**(45): 1977-1984.

3. Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**(12): 1840-1846.
4. Noskin GA, Rubin RJ, Schentag JJ, Kluytmans J, Hedblom EC, Smulders M, et.al. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. *Arch Intern Med* 2005; **165**(15): 1756-1761.
5. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et.al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 2007; **298**(15): 1763-1771.
6. Zeinali E, Moniri R, Safari M, Mousavi GA. Molecular characterization and *SCCmec* typing in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Feyz, J Kashan Univ Med Sci* 2011; **14**: 439-446.
7. Tesch W, Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bachi B. Evidence of a novel staphylococcal mec-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1990; **34**(9): 1703-1706.
8. Flannagan SE. Plasmid content of a vancomycin-resistant Enterococcus faecalis isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a *vanA* phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**(12): 3954-3959.
9. Zhang Kj, Mcclure S, Elsayed T, Louie M, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbial* 2005; **43**: 5026-5033.
10. Daskalaki M, Otero JR, Sanz F, Chaves F. Bacteremia due to clonally derived methicillin-resistant, gentamicin-susceptible isolates and methicillin-susceptible, gentamicin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbial* 2007; **45**: 3446-3448.
11. McDougal LK , Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC, et.al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aurous* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbial* 2003; **41**(11): 5113-5120.
12. Hou BP, Zhou S, Hua DH, Yao F. Staphylococcal cassette chromosome mec (*SCCmec*) analysis and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in a teaching hospital, Shantou, China. *Afr J Microbial Res* 2010; **4**(9): 844-848.
13. Manikandan SG, Hemalatha M, Lakshminarasimhan C, Thajuddin N. Isolation and amplification of *femA* gene from MRSA isolates. *Int J Pharma Bio Sci* 2011; **2**(3): 28-32.
14. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st ed. CLSI document M100-S21. CLSI, Wayne, PA. 2011.
15. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 2010–2012. In F. M. Ausubel, Bent R, Kingston RE. (ed.), *Current protocols in molecular biology*. J. Wiley & Sons, New York, N.Y. 1987.
16. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 264–274.
17. Milheiric OC, Oliveira DC, Lencastre DH. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents Chemother* 2007b; **51**: 3374-3377.
18. Liu D. *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*. Taylor and Francis CRC Press Publ, Florida, USA. 2011.
19. Najarpeerayeh SH, Azimian A, Mostafaee M, Siadat SD. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by disc diffusion method, determination of MIC and PCR for *mecA* gene. *J Med Sci Pathobiology* 2009; **12**(3): 61-69.
20. Venkatakrishna RL, Kishore BG, Manohar KS, Shantaram PVM. Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Comparison of Disc diffusion and MIC with *mecA* gene detection by PCR. *Int J Pharm Bio Sci* 2011; **12** (1): 518-521.
21. Sangeetha G, John J, Ranjith J. Comparison of different phenotypic methods with PCR detection of *mecA* gene for detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Pharm Scih* 2012; **4**(4): 495-497.
22. Abdollahi A, Koohpayeh A, Najafipour S, Mansouri Y, Abdollahi S, Jafari S. Evaluation of drug esistance and *SCCmec* genotype in MRSA strains. *Behdad* 2012; **1**: 47-52.
23. Japoni A, Jamalidoust M, Farshad S, Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni S, et.al. Characterization of *SCCmec* types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Iran. *Jpn J Infect Dis* 2011; **64**: 28-33.
24. Sadeghi J, Mansouri S. Molecular characterization and antibiotic resistance of clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus obtained from Southeast of Iran (Kerman). APMIS. 2013; DOI: 10.1111/apm.12158.
25. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, van Belkum A, Neela V. A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome mec types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. J Med Microbial* 2010; **59**: 1135-1139.
26. Milheiric OC, Oliveira DC, Lencastre DH. (2007b). Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aurous. Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2007; **51**: 3374-3377.
27. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 2006; **368**(9538): 874-885.

28. Ahmadishoar SH, Nahaei MR, Amirmozafari N. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens against vancomycin by using E-test in Tabriz. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2008; **30**(2): 17-23.
29. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tien-sasitorn M, et.al. Staphylococcal cassette chromosome mec (*SCCmec*) typing of MRSA strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a newnomenclature for *SCCmec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother* 2006; **50**: 1001-1012.
30. Makgotlho PE, Kock MM, Hoosen. Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. *FEMS Immunology Med Microbial* 2009; **57**: 104-115.
31. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (*SCCmec*): guidelines for reporting novel *SCCmec* elements. *Antimicrobial. Agents Chemotherapy* 2009; **53**: 4961-4967.
32. Hassibi M, Mohajer Iravani B, Seifi M, Jafari S, Hadi zade M, Saadat P. Prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aurous. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2007; **1**(1): 71-72.
33. Moise PA, Smyth DS, Robinson DA, El-Fawal N, McCalla C, Sakoulas G. Genotypic and phenotypic relationships among methicillin-resistant *Staphylococcus aurous* from three multicenter bacteremia studies. *J Anitimicrob Chemotherapy* 2009; **63**: 873-876.
34. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aurous* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2009; **64**: 441-446.