

Phenotypic and Genotypic Evaluation of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Children in Tehran Children's Medical Center, 2016

Shima Mahmoudi¹,
Setareh Mamishi^{1,2},
Fatemeh Hasanvand³,
Mona Seif⁴,
Babak Pourakbari¹

¹ PhD in Medical Bacteriology, Pediatric Infectious Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Professor, Department of Pediatric Infectious Diseases, Pediatric Center of Excellence, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

⁴ MSc in Microbiology, Islamic Azad University, Guilan Science and Research Branch, Guilan, Iran

(Received June 2, 2019 ; Accepted August 26, 2019)

Abstract

Background and purpose: The aims of this study were to evaluate the antibiotic resistance of Healthcare-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) and Community associated MRSA (CA-MRSA)-resistant strains of *Staphylococcus aureus* strains and to investigate the frequency of different types of spa typing, SCCmec I, II, III, IV, V, and type IV, among the strains of MRSA isolated from clinical specimens of children in Tehran Children's Medical Center Hospital.

Materials and methods: In this cross-sectional study, antibiotic susceptibility test was performed using Kirby-Baer method according to the CLSI guidelines. Presence of *mecA*, *PVL*, *spa* genes, as well as different types of SCCmec I, II, III, IV, V, and major subtypes of SCCmec IV were investigated using Multiplex PCR.

Results: Among 133 clinical isolates of *S. aureus*, 70 (53%) were methicillin-susceptible (MSSA) and 63 (47%) were MRSA. The *mecA* and *PVL* genes frequency distributions among MRSA strains were 100% and 3.1%, respectively. In the present study, there were 5 SCCmec (I-V) types, indicating wide variations in the hospital investigated. In addition, high prevalence of SCCmec III (30.1%) and III + Iva (23.8%) was observed. Of 63 strains of MRSA, 46 were classified into 11 spa types. The most common type was spa t037 that was found in 53.9% (n= 34) of the strains.

Conclusion: High prevalence of SCCmec III + Iva and emergence of CA-MRSA strains in hospitals can be a serious warning to practitioners and infection control committees.

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Pantone-Valentine leukocidin, spa typing, SCCmec typing

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (177): 30-41 (Persian).

* Corresponding Author: Babak Pourakbari - Pediatric Infectious Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: pourakbari@sina.tums.ac.ir)

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از کودکان مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان در سال ۱۳۹۵

شیما محمودی^۱
ستاره ممیشی^{۲،۱}
فاطمه حسنونند^۳
منا سیف^۴
بابک پوراکبری^۱

چکیده

سابقه و هدف: این مطالعه با هدف بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بیمارستانی (HA-MRSA) و اکتسابی از جامعه (CA-MRSA) و بررسی فراوانی تیپ‌های مختلف spa typing، SCCmec I,II,III,IV,V و زیر تیپ‌های عمده تیپ IV در میان سویه‌های MRSA جدا شده از نمونه‌های بالینی کودکان مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش کربی-بائر و مطابق با دستورالعمل‌های CLSI انجام شد. حضور ژن‌های *spa*، *PVL*، *mecA* و همین‌طور تیپ‌های مختلف SCCmec I,II,III,IV,V و زیر تیپ‌های عمده SCCmec IV با استفاده از روش Multiplex PCR بررسی شد.

یافته‌ها: از میان ۱۳۳ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۷۰ (۵۲/۶ درصد) سویه حساس به متی‌سیلین (MSSA) و ۶۳ (۴۷/۴ درصد) سویه مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) گزارش شد. توزیع فراوانی ژن‌های *mecA* و *PVL* در میان سویه‌های MRSA به ترتیب ۱۰۰ و ۳/۱ درصد گزارش گردید که در مطالعه‌ی حاضر ۵ تیپ SCCmec (I-V) یافت شد که نشان‌دهنده تنوع تیپی وسیع در بیمارستان است. به علاوه فراوانی بالای تیپ SCCmec III (۳۰/۱ درصد) و III+Iva (۲۳/۸ درصد) مشاهده شد. از ۶۳ سویه MRSA، ۴۶ سویه از نظر لوکوس پروتئینی A قابل تیپ‌بندی بودند که در ۱۱ تیپ دسته بندی شدند. شایع‌ترین تیپ یافت شده spa t037 بود که در ۵۳/۹ درصد (n=۳۴) از سویه‌ها یافت شد.

استنتاج: فراوانی بالای SCCmec III+Iva و ظهور سویه‌های CA-MRSA در میان بیمارستان می‌تواند یک هشدار جدی به پزشکان و بخش‌های کنترل عفونت باشد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، لکوسیدین پنتون والتین (PVL)، spa typing، SCCmec typing

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن انسانی مهم و مسئول بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی است (۱). در میان اولین عوامل ضدمیکروبی، بتا-لاکتام‌ها یکی از موثرترین کلاس‌های ضدمیکروبی هستند که در پزشکی استفاده می‌شوند. متی‌سیلین یک پنی‌سیلین نیمه سنتتیک و یک عامل ضدمیکروبی مقاوم به بتالاکتاماز است که

E-mail: pourakbari@sina.tums.ac.ir

مؤلف مسئول: بابک پوراکبری- تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران

۱. دکترای باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. استاد، گروه بیماری‌های عفونی کودکان، بیمارستان مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات گیلان، گیلان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۳/۱۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۶/۴

در سال ۱۹۶۰ معرفی گردید و سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بلافاصله پس از معرفی متی سیلین گزارش شدند (۳،۲). سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) به واسطه تولید یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین ('PBP2a or PBP2') میل ترکیبی پایینی برای اتصال با متی سیلین یا دیگر بتالاکتام ها دارد. این پروتئین توسط ژن *mecA* در کاست کروموزومی استافیلوکوک *mec* (SCCmec) کد می شود (۴). بر اساس تعریف مرکز کنترل و پیشگیری بیماری (CDC) در سال ۲۰۱۰، عفونت های ناشی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتساب شده از بیمارستان (HA-MRSA) به عفونت های ناشی از سویه های MRSA اطلاق می شود که ۴۸ ساعت بعد از پذیرش بیمار جدا می شوند. در حالی که عفونت ناشی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتساب شده از جامعه (CA-MRSA) به هر نوع عفونت ناشی از سویه های MRSA گفته می شود که ظرف ۴۸ ساعت اولیه پذیرش بیمار در بیمارستان جدا شده و و بیمار فاقد ریسک فاکتورهای HA-MRSA باشد. سویه های CA-MRSA بسیار بیماریزا تر و با قابلیت انتشار بالاتر تر از سویه های HA-MRSA هستند (۵،۶). در گذشته MRSA به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی تلقی می شد، در حالی که گزارشات یک روند رو به رشد از سویه های CA-MRSA را نشان می دهد. این سویه ها ممکن است در آینده جایگزین سویه های HA-MRSA شوند (۷). افزایش طول مدت بستری بیمار، استفاده از ونتیلاسیون و مصرف آنتی بیوتیک طولانی مدت جز ریسک فاکتورهای HA-MRSA به حساب می آیند (۸). سویه های MRSA به هشت تیپ و زیر تیپ طبقه بندی می شوند و تیپ های SCCmec I,II,III توسط سویه های HA-MRSA حمل شده، در حالی که سویه های CA-MRSA حاوی تیپ های جدید، کوچک و متحرک SCCmec IV and V می باشند (۹،۱۰). تیپ های I,IV,V SCCmec تنها حاوی یک ژن مقاومت به متی سیلین است در حالی

که SCCmec types II,III ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های توبرامایسین، کانامایسین و ماکرولید-لینکوزامید-استرپتوگرامین را نیز حمل می کنند (۱۱). ایران در مقایسه با کشورهای همسایه (به جز عراق) بیشترین فراوانی MRSA را در خاورمیانه دارد. شیوع سویه های MRSA در ایران بیش از ۵۰ درصد گزارش شده است (۱۴-۱۲). وجود سویه های HA-MRSA در ایران معمول بوده و این در حالی است که سویه های CA-MRSA به ندرت گزارش می گردد (۱۵،۷). سویه های CA-MRSA اغلب حاوی ژن کد کننده توکسین لکوسیدین پنتون والتین (PVL) هستند، این در حالی است که سویه های HA-MRSA ندرتا حامل این ژن می باشند (۱۶). امروزه بسیاری از رده های MRSA دارای دو تیپ همزمان هستند و اخیرا بسیاری تیپ ها، زیر تیپ ها و عناصر متفاوت SCCmec، گزارش شده است. ژن *spa* در استافیلوکوکوس اورئوس، پروتئین A را کد می کند و به عنوان یک روش تیپ بندی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) استفاده می شود. ژن *spa* شامل یک ناحیه پلی مورفیک متغیر است که تایپینگ آن بر اساس تکرار توالی تکراری (عمدتا ۲۴ bp) و بروز موتاسیون هایی از قبیل deletions و duplications صورت می گیرد (۱۷). مطالعات اندکی در ایران در مورد بررسی ژنتیکی سویه های HA-MRSA و CA-MRSA جدا شده از کودکان (SCCmec typing و *spa* typing) وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های HA-MRSA و CA-MRSA و بررسی فراوانی تیپ های مختلف SCCmec I,II,III,IV,V، *spa* typing و زیر تیپ های عمده تیپ IV در میان سویه های MRSA جدا شده از نمونه های بالینی کودکان مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی - مقطعی، در دانشگاه علوم

پزشکی تهران با کد اخلاق ۲۵۴۶۲۳-۱۶۳۵۰-۸۸-۰۳-۹۱، تصویب شد. معیار ورود به مطالعه شامل کلیه نمونه‌های بالینی/استافیلوکوکوس/اورئوس جدا شده از کودکان (۱۳۳ نمونه) مراجعه‌کننده به مرکز طبی کودکان تهران طی سال، ۱۳۹۵ بوده است. نمونه‌های بالینی (ادرار، خون، آبسه، مغز استخوان، چشم، کشاله ران، پریکارد، مایع مفصلی، تراشه، بینی، زخم و کاتتر) از بخش‌های مختلف بیمارستان شامل (اورژانس، عفونی، گوارشی، بیماران سرپایی، جراحی، انکولوژی، روماتولوژی، بخش‌های مراقبت ویژه، NICU و PICU) جداسازی شد. معیار خروج از مطالعه شامل نمونه‌های تکراری استافیلوکوکوس/اورئوس جدا شده از یک بیمار بوده است که نمونه تکراری حذف گردید.

جداسازی باکتریایی

جدایه‌ها پس از کشت به روش‌های مرسوم برای سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس، با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی استاندارد از جمله، تخمیر قند مانیتول و تحمل ۶/۵ درصد نمک، کاتالاز، اکسیداز و DNase تایید شدند (۱۸). سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس حساس به متی‌سیلین (MSSA) از سویه‌های MRSA به واسطه‌ی کشت روی محیط مولر هینتون آگار حاوی ۶ mg/ml اگزاسیلین غنی شده با ۴ درصد NaCl تمیز داده شدند. جدایه‌های رشد یافته روی این محیط به عنوان سویه‌های MRSA گزارش شدند.

جدایه‌های کشت داده شده پس از گذشت ۴۸ ساعت از پذیرش بیمار در بیمارستان با سابقه دریافت اقدامات درمانی به عنوان سویه‌های HA-MRSA و جدایه‌های کشت داده شده طی ۴۸ ساعت ابتدای پذیرش بیمار در بیمارستان بدون سابقه دریافت هر گونه اقدامات درمانی به عنوان سویه‌های CA-MRSA در نظر گرفته شدند.

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

روش استاندارد دیسک دیفیوژن (کربی-باثر) برای آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین، ریفامپاسین، آمیکاسین،

آموکسی‌کلاو، پنی‌سیلین، کلرامفنیکل، تری متوپریم سولفامتو کسازول، سفازولین و سفالوتین بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد و از E-test جهت بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس به ونکوماپسین استفاده شد (۱۵).

استخراج DNA

استخراج DNA از سویه‌های MRSA با استفاده از آنزیم لیزواستافین و به روش فنل/کلروفرم صورت گرفت (۱۹).

شناسایی ژن *mecA*

تمامی ایزوله‌های احتمالی MRSA از طریق تکثیر قطعه *mecA* با استفاده از پرایمرهای F= 5'ACTGCTATCCACCTCAAAC-3' و R= 5'CTGGTGAAGTTGTAATCTGG-3 تایید شدند (۱۵).

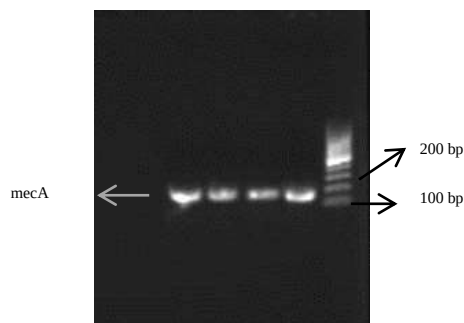
تعیین تیپ‌های *SCCmec*

طی این واکنش Master mix استفاده شده حاوی ۲/۵ μl بافر واکنش (100 mmol/L Tris-HCl [pH 8.3], 500 mmol/L KCl)، ۰/۵ μl MgCl₂، ۰/۲ μl پلی‌مرز DNA (Taq)، ۰/۵ μl مخلوط (dATP, dUTP, dGTP, dACP dNTP)، ۰/۵ μl از هر پرایمر R، ۰/۵ μl از هر پرایمر F و ۱۰-۱۰۰ ng از DNA الگو بود. حجم نهایی واکنش با افزودن آب مقطر استریل روی ۲۵ μl تنظیم شد. Multiplex-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems) و با برنامه دنا تورا سیون اولیه ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، سیکل مرحله دنا تورا سیون در ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ °C به مدت ۶۰ ثانیه (annealing)، ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه برای اکستنشن نهایی و در نهایت نگهداری در ۴ °C انجام شد (۱۵).

آماري SPSS version 17 گردید. نتایج به صورت درصد و فراوانی گزارش شد و اطلاعات حاصل به صورت جداول و نمودار مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

از ۱۳۳ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس، ۷۰ (۵۳ درصد) سویه MSSA و ۶۳ (۴۷ درصد) سویه MRSA گزارش شدند. تمامی سویه های MRSA با استفاده از متدهای فوتوتیپی و ژنوتیپی تایید شدند (تصویر شماره ۱). سویه های MRSA از بیماران با رده سنی ۱ روزه تا ۱۰ ساله (با میانگین سنی ۱/۶، ۴۹ درصد مونث و ۵۱ درصد مذکر) جدا گردید که بالاترین فراوانی در گروه سنی زیر دو سال (۶۷ درصد) مشاهده شد. همچنین از ۶۳ سویه MRSA، ۴۸ (۷۶ درصد) سویه HA-MRSA و ۱۵ (۲۴ درصد) سویه CA-MRSA تعیین شدند. هیچ رابطه معنی داری میان سن، جنس و شیوع سویه های MRSA یافت نشد.



تصویر شماره ۱: محصول PCR ژن *mecA* (۱۴۷ bp)

بیشترین سویه های MRSA (۳۲ درصد) از خون جدا شد و همچنین بیشترین شیوع سویه های MRSA در میان بیماران سرپایی (۲۵ درصد) و بخش NICU (۲۱ درصد) و کمترین آن در بخش گوارش (۶ درصد) یافت شد.

حساسیت آنتی بیوتیکی

مقاومت به سفالوتین (۷۹ درصد)، سفازولین (۸۱ درصد)، تری متوپریم سولفامتوکسازول (۸۶ درصد)،

توالی پرایمرهای اختصاصی SCCmec types I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd and V مورد استفاده در این مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه شده است. از الکتروفورز برای جداسازی محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) ژن های مورد نظر استفاده شد.

جدول شماره ۱: پرایمر های مورد استفاده برای تیپ های مختلف SCCmec (۹)

تیپ	سایز قطعه تکثیری	توالی اولیگونوکلئوتیدی (5'→3')	پرایمر
SCCmecI	۶۱۳	GCITTTAAAGAGTGTCTGACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	Type I-F Type I-R
SCCmec II	۳۹۸	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	Type II-F Type II-R
SCCmec III	۲۸۰	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTGTAACAGATCG	Type III-F Type III-R
SCCmecIVa	۷۷۶	GCCTTATTGGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTGC	Type IVa-F Type IVa-R
SCCmecIVb	۴۹۳	TCTGGAATTACTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	Type IVb-F Type IVb-R
SCCmecIVc	۲۰۰	ACAATATTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	Type IVc-F Type IVc-R
SCCmecIVd	۸۸۱	CTCAAAATACGGACCCCAATACA TGTCACAGTAATGTCTAAAG	Type IVd-F5 Type IVd-R6

تعیین ژن لکوسیدین پنتون والتین (pvl)

پرایمرهای اختصاصی
 $F=5'-ATCATTAGGTAAAAATGCTGTCACATGATCCA-3'$
 $R=5'-GCATCAACTGTATTGGATAG CCAAAAAGC-3'$
 جهت شناسایی ژن PVL به کار برده شد. از استافیلوکوکوس اورئوس سویه ACTC49775 به عنوان کنترل مثبت برای تشخیص ژن PVL استفاده گردید.

تیپ بندی spa

ناحیه پلی مورفیک X از ژن کد کننده پروتئین A (spa) استافیلوکوکوس اورئوس توالی یابی و تیپ بندی شد (۲۰). ناحیه پلی مورفیک X پروتئین A/استافیلوکوکوس اورئوس سویه های MRSA به وسیله PCR تکثیر شد و جهت sequencing به کشور کره ارسال گردید. نتایج حاصل از sequencing توسط نرم افزار Ridom StaphType software آنالیز شد و سپس تیپ های مختلف spa با استفاده از وارد کردن توالی در سایت <http://spa.ridom.de/spatypes.shtml> مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه داده ها، وارد نرم افزار

کلیندامایسین (۲۴ درصد)، آمیکاسین (۸۹ درصد)، آموکسی کلاو (۹۷ درصد)، ریفامپیسین (۵ درصد) و کلرامفنیکل (۲۹ درصد) گزارش شد. تمامی سویه‌های MRSA حساس به ونکومایسین (۱۰۰ درصد) و مقاوم به پنی سیلین (۱۰۰ درصد) بودند.

تعیین تیپ *spa*

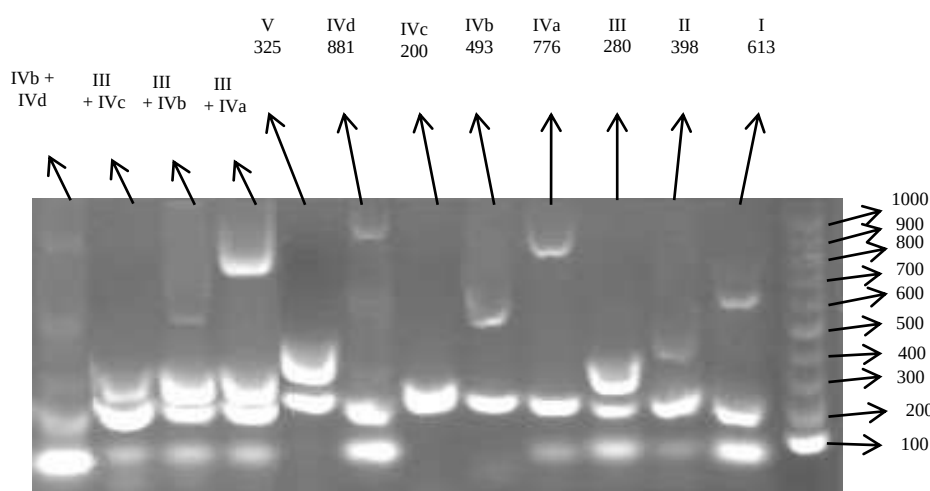
از تمامی ۶۳ سویه MRSA، ۴۶ سویه از نظر لوکوس پروتئینی A قابل تیپ بندی بودند که در ۱۱ تیپ دسته بندی شدند (جدول شماره ۳). شایع ترین تیپ یافت شده *spa* t037 تعیین شد که در ۵۴ درصد (n=۳۴) از سویه ها یافت شد.

تیپ بندی *SCCmec*

فراوانی تیپ های مختلف *SCCmec* تعیین شده در میان سویه های CA-MRSA و HA-MRSA در جدول شماره ۲ ارائه شده است. از میان سویه های MRSA، ۳۶ سویه (۵۷ درصد) تنها دارای یک تیپ *SCCmec* و ۲۵ سویه

جدول شماره ۲: فراوانی تیپ های *SCCmec* و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های MRSA جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان

SCCmec types	سفالوتین	سفالوزین	تری متوپریم سولفات/توکسازول	کلرامفنیکل	پنی سیلین	آمیکاسین	آموکسی کلاو	ریفامپین	کلیندامایسین	ونکومایسین	تعداد (درصد)
I	۱	۱	۱	۰	۲	۲	۲	۰	۰	۰	(۳) ۲
II	۲	۲	۲	۰	۴	۳	۴	۰	۰	۰	(۶) ۴
III+IVb	۳	۳	۳	۰	۳	۳	۳	۰	۰	۰	(۵) ۳
III+IVc	۴	۴	۴	۰	۴	۴	۴	۰	۰	۰	(۶) ۴
IVa	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰	(۲) ۱
CA	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۰	۲	۰	(۳۰) ۱۹
HA	۱۷	۱۷	۱۷	۷	۱۷	۱۷	۱۷	۱	۵	۰	
CA	۱	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۰	۱	۰	(۵) ۳
HA	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰	
CA	۱	۱	۰	۰	۲	۲	۲	۰	۰	۰	(۵) ۳
HA	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	
CA	۲	۲	۲	۰	۲	۱	۱	۰	۰	۰	(۲۴) ۱۵
HA	۱۲	۱۲	۱۲	۶	۱۳	۱۳	۱۳	۱	۵	۰	
CA	۱	۲	۱	۱	۲	۲	۲	۱	۱	۰	(۵) ۳
HA	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰	
CA	۰	۰	۲	۰	۲	۱	۲	۰	۰	۰	(۶) ۴
HA	۱	۱	۲	۰	۲	۱	۲	۰	۰	۰	(۳) ۲
CA	۱	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۰	۱	۰	(۱۰۰) ۶۳
HA-MRSA + CA-MRSA	۵۰ (۷۹)	۵۱ (۸۱)	۵۴ (۸۶)	۱۸ (۲۹)	۶۳ (۱۰۰)	۵۶ (۸۹)	۶۱ (۹۷)	۳ (۵)	۱۵ (۲۴)	۰ (۰)	
غیر قابل تیپ بندی											
فراوانی کلی (n: ۶۳)											



تصویر شماره ۲: محصول Mutiplex PCR به منظور شناسایی تیپ های *SCCmec* سویه های MRSA

جدول شماره ۳: فراوانی تیپ های spa و ژن PVL در میان سویه های MRSA با تیپ های مختلف SCCmec

PVL	t037	t325	t4276	t4478	t1149	t2523	t1358	t002	t1816	t310	t790	تیپ های SCCmec
۰	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	I
۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	II
۱	۱۶	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	III
—	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۱	IVa
—	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	IVc
—	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	IVd
—	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	III+IVa
—	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	III+IVb
—	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	III+IVc
—	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	Iva+IVb
—	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	V
—	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	غیر قابل تیپ بندی
۲	۳۴	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	فراوانی کلی
۳	۵۴	۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	درصد

شیوع ژن PVL در میان تمامی سویه های MRSA (۳ درصد) بود که تنها در دو سویه HA-MRSA یافت شد در حالی که تمامی سویه های CA-MRSA فاقد ژن PVL بودند. هیچ ارتباط معنی داری میان PVL و CA-MRSA و HA-MRSA مشاهده نشد.

بحث

در دهه های اخیر عفونت ناشی از سویه های MRSA اکتسابی از جامعه به یک تهدید جهانی برای سلامت عموم تبدیل شده است. استفاده ی گسترده از آنتی بیوتیک های بتالاکتام در ایران باعث ظهور گسترده MRSA های MDR می شود و در نتیجه افزایش هزینه های درمانی و محدود شدن گزینه های درمانی را همراه دارد (۲۱). شیوع بالایی از مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در مطالعه حاضر یافت شد. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین و آموکسی کلاو در مطالعه حاضر به ترتیب ۱۰۰ و ۹۷ درصد تعیین شد که با مطالعات قبلی در ایران و ایتالیا هم خوانی داشته است (۲۲،۲۱). همان طور که در سایر مطالعات نیز ذکر شده است، سویه های MRSA نه تنها به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بلکه به آمینو گلیکوزیدها و لینکوزامیدها نیز مقاوم هستند. در مطالعه حاضر میزان مقاومت به کلیندامایسین ۲۴ درصد گزارش شد که با میزان مقاومت گزارش شده توسط عسگریان (۲۲ درصد) هم خوانی داشت اما با

میزان مقاومت گزارش شده توسط گودرزی (۴۹/۹ درصد)، مهدیون (۶۷/۴ درصد)، رضایی (۵۴ درصد) و کدخدا (۴۲ درصد) در ایران و wang در تایوان (۸۶/۵ درصد) تطابق نداشته است (۲۳-۲۶،۲۱). میزان مقاومت به آمیکاسین در این مطالعه (۸۹ درصد) گزارش شد که بیش از میزان مقاومت به آمیکاسین گزارش شده توسط گماریان (۴/۰۵ درصد) و بوکائیان (۴۲/۰۱ درصد) در ایران بود (۲۸،۲۷). این عدم تطابق از افزایش چشم گیر مقاومت به آمیکاسین در میان سویه های MRSA خبر می دهد. اخیراً تری متوپریم سولفامتوکسازول به عنوان یک داروی جایگزین جهت درمان عفونت های MRSA در نظر گرفته شده است. میزان مقاومت به این آنتی بیوتیک در میان ۶۳ جدایه MRSA در این مطالعه (۸۶ درصد) گزارش شد که با میزان مقاومت گزارش شده توسط رضایی و همکاران هم خوانی داشت (۲۶). براساس مطالعه ی انجام شده توسط کدخدا مقاومت به ونکومایسین (۰ درصد) گزارش شد که با مطالعه ی ما هم خوانی داشته است (۲۹). همچنین میزان حساسیت به پنی سیلین در مطالعه ی حاضر ۱۰۰ درصد بود که با مطالعه ی گماریان (۱۰۰ درصد) و گودرزی (۹۷/۷ درصد) مطابقت داشته است (۲۸،۲۱).

در مطالعه حاضر ۵ تیپ (I-V) SCCmec به همراه زیر تیپ های مختلفی SCCmec IV یافت شد که خود حاکی از تنوع تیبی وسیع در بیمارستان است. SCCmec III به عنوان شایع ترین تیپ (۳۰ درصد) در میان ۱۹ سویه

MRSA این مطالعه یافت شد که با نتایج حاصل از مطالعات ژاپنی (۷۴/۳ درصد) و پرهیزگار (۹۵/۷ درصد) نیز هم‌خوانی داشت (۳۱،۳۰). در واقع شیوع بالای SCCmec III در میان سویه‌های MRSA، حاکی از آن است که این سویه‌ها عمدتاً منبع بیمارستانی دارند. از ۱۹ سویه حاوی SCCmec III در این مطالعه ۲ سویه اکتسابی از جامعه بود. احتمال دارد این تیپ به عنوان یک تیپ بیمارستانی با شیوع بالا، از بیمارستان‌ها در حال ورود به جامعه باشد. فراوانی بالای تیپ SCCmec III بیانگر گسترش سویه‌های MRSA با مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی است. با توجه به این که در مطالعه‌ی حاضر تقریباً تمامی سویه‌های MRSA حاوی SCCmec III دارای الگوی مقاومت MDR بودند می‌توان بیان کرد که شیوع سویه‌های MDR در میان جدایه‌های SCCmec III بیش از سویه‌های MDR حاوی SCCmec IV است (۳۳،۳۲).

شیوع SCCmec IVa, IVb, IVc در این مطالعه به ترتیب ۵، ۰ و ۲ درصد تعیین شد که با مطالعه صورت گرفته توسط رضایی (۳/۸ درصد، IVa) و ممتاز (۷/۴۵ درصد، IVc) هم‌خوانی دارد (۳۴). در مطالعه حاضر زیرتیپ‌های IV در هر دو سویه‌ی CA و HA مشاهده شدند. اغلب زیر تیپ‌های SCCmec IV به صورت مشترک با تیپ III که به عنوان تیپ بیمارستانی مطرح است، مشاهده شدند. ممکن است این مساله گویای ورود تیپ‌های اکتسابی از جامعه به بیمارستان‌ها باشد. SCCmec III+IVa دومین تیپ شایع بود که در ۲۴ درصد از سویه‌های MRSAی این مطالعه یافت شد. افزایش شیوع همزمان دو تیپ SCCmec در میان سویه‌های MRSA خود نشان دهنده‌ی تغییر الگوی ژنتیکی این سویه‌ها به سمت بیمارزایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیش‌تر است. اگر چه SCCmec IV حاوی ژن‌های اضافی برای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام نیست، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیش از نیمی از سویه‌های دارای SCCmec IV دارای الگوی مقاومتی MDR هستند. الگوی مقاومت چندگانه (MDR) در

سویه‌های دارای SCCmec IV می‌تواند ناشی از اکتساب ژن‌های مقاومت دیگر پس از قرار گیری در معرض فشارهای آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان باشد. SCCmec V تنها در ۶ درصد از MRSA های مورد بررسی در این مطالعه با هر دو منشأ بیمارستانی و جامعه مشاهده شد که با نتایج حاصل از مطالعات ژاپنی (۲/۶ درصد) و زینعلی (۳/۴ درصد) تطابق داشت (۳۰،۵). اگر چه حضور ژن PVL به طور گسترده‌ای با SCCmec IV و ندرتا با SCCmec V در ارتباط است در مطالعه‌ی حاضر تنها دو سویه HA-MRSA (۳ درصد) حاوی SCCmec I and II واجد ژن PVL یافت شد. این یافته‌ها با نتایج حاصل از بررسی شیوع PVL توسط ژاپنی در ایران (۱۴/۳ درصد) (۳۰) و Dan Yao (۳۸ درصد: CA-MRSA و ۱۳ درصد: HA-MRSA) (۳۵) هم‌خوانی نداشت. همچنین هیچ رابطه معنی‌داری میان سویه‌های حاوی PVL در این مطالعه و سویه‌های HA-MRSA و CA-MRSA یافت نشد. در این مطالعه براساس spa typing ۶۳ سویه MRSA، ۱۱ تیپ مختلف t037 (۵۴ درصد)، t325 (۵ درصد)، t4478، t4276، t1149، t2523، t1358، t002، t1618، t310 و t790 (۱/۵ درصد) مشاهده شد. بر اساس مطالعاتی که توسط گودرزی (۳۳/۳ درصد) و میرزایی (۴۳ درصد) صورت گرفت، t037 به عنوان شایع‌ترین تیپ spa در ایران گزارش شد (۳۶،۲۱). شیوع تیپ‌های مختلف spa بر اساس نواحی جغرافیایی مختلف متفاوت است و می‌تواند در طول زمان تغییر کند (۲۱). تیپ t002 که در سایر مطالعات به عنوان یک تیپ رایج گزارش شده بود، در این مطالعه تنها در سویه‌های حاوی SCCmec IVd و t1618 تنها در سویه‌های حاوی SCCmec IVc مشاهده شد. می‌توان چنین اظهار داشت که تیپ‌های مختلف spa در مطالعات بیمارستانی مختلف در حال گردش هستند. این امر نشان دهنده نیاز به انجام مطالعات بعدی به منظور بررسی توزیع سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و در نتیجه کنترل بهتر و موثرتر عفونت دارد (۳۷). به نظر می‌رسد اپیدمیولوژی سویه‌های MRSA

میان بیمارستان‌ها و مراکز درمانی می‌تواند یک هشدار جدی به پزشکان و بخش‌های کنترل عفونت در سیستم‌های بهداشتی در جهت مصرف صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل عفونت‌ها و جلوگیری از شیوع عفونت‌ها با مقاومت چندگانه باشد. همچنین به دلیل احتمال وقوع شدت بالاتر بیماری‌های ایجاد شده توسط سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن *pvl*، تشخیص و درمان زود هنگام این سویه‌ها توصیه می‌شود.

در حال تغییر است به طوری که سویه‌های MRSA جدا شده، محدود به بیماران بستری یا افراد با خطر زمینه‌ای نمی‌باشد. امروزه یک سیکل اپیدمیولوژیک کامل و برگشت‌پذیر از سویه‌های CA-MRSA از مکان مبدایشان در جامعه به داخل بیمارستان معرفی شده است. در بعضی بیمارستان‌ها سویه‌های CA-MRSA جایگزین سویه‌های HA-MRSA شده‌اند. فراوانی بالای SCCmec III+Iva و ظهور سویه‌های CA-MRSA در

References

1. Sabouni F, Mahmoudi S, Bahador A, Pourakbari B, Sadeghi RH, Ashtiani MT, 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.
2. Elements IWGotCoSCC. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 4961-4967.
3. Khosravi AD, Hoveizavi H, Farshadzadeh Z. The prevalence of genes encoding leukocidins in *Staphylococcus aureus* strains resistant and sensitive to methicillin isolated from burn patients in Taleghani Hospital, Ahvaz, Iran. *Burns* 2012; 38(2): 247-251.
4. Ghaznavi-Rad E, Shamsudin MN, 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 Microbiol* 2010; 59(10): 1135-1139.
5. Zeinali E, Moniri R, Safari M, Mousavi SGA. Molecular characterization and SCCmec typing in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *FEYZ* 2011; 14(4): 439-446.
6. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2010; 375(9725): 1557-1568.
7. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, NaderiNasab M. Epidemiology of mecA-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(5): 1010-1019.
8. Shuping LL, Kuonza L, Musekiwa A, Iyaloo S, Perovic O. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A cross-sectional analysis of risk factors in South African tertiary public hospitals. *PloS One* 2017; 12(11): e0188216.
9. Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Louie T, 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 Microbiol* 2005; 43(10): 5026-5033.
10. Kobayashi SD, DeLeo FR. An update on community-associated MRSA virulence. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9(5): 545-551.

11. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis* 2005; 40(4): 562-573.
12. Aligholi M, Emameini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, Sedaght H. Emergence of high-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. *Med Princ Pract* 2008; 17(5): 432-434.
13. Dezfulian A, Aslani MM, Oskoui M, Farrokh P, Azimirad M, Dabiri H, et al. Identification and characterization of a high vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring VanA gene cluster isolated from diabetic foot ulcer. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(2): 803-806.
14. Sabouni F, Ranjbari R, Pourakbari B, Mahmoudi S, Teymuri M, Ashtiani MT, et al. *Staphylococcus aureus* infections in children in an Iranian referral pediatric hospital. *J Prev Med Hyg* 2013; 54(4): 205-207.
15. Mamishi S, Mahmoudi S, Sadeghi R, Movahedi Z, Hadipour R, Pourakbar B. Genotyping of *Staphylococcus aureus* strains among healthcare workers and patients in the tertiary referral Children's Medical Hospital in Tehran, Iran. *Br J Biomed Sci* 2012; 69(4): 173-177.
16. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(3): 616-687.
17. Omar NY, Ali HA, Harfoush RA, El Khayat EH. Molecular Typing of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates on the Basis of Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. *Int J Microbiol* 2014; 2014: 650328.
18. Tille P. Bailey & Scott's diagnostic microbiology-E-Book. 13th ed. Missouri, Mosby; 2015.
19. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* 1961; 3(2): 208-218.
20. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrügge C, Keckevoet U, Friedrich AW, Harmsen D, et al. Characterization of clonal relatedness among the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using spa sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2805-2808.
21. Goudarzi M, Goudarzi H, Figueiredo AMS, Udo EE, Fazeli M, Asadzadeh M, et al. Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from intensive care units in Iran: ST22-SCCmec IV/t790 emerges as the major clone. *PloS One* 2016; 11(5): e0155529.
22. Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8(1): 22.
23. Wang W-Y, Chiueh T-S, Sun J-R, Tsao S-M, Lu J-J. Molecular typing and phenotype characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from blood in Taiwan. *PloS One* 2012; 7(1): e30394.
24. Mahdiyoun SM, Kazemian H, Ahanjan M, Houri H, Goudarzi M. Frequency of aminoglycoside-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from hospitalized patients. *Jundishapur J Microbiol* 2016; 9(8): e35052.
25. Kadkhoda H, Ghalavand Z, Nikmanesh B, Houri H, Taghizadehmaleki D, Eslami G. Virulence factors evaluation in methicillin-

- sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from children referred to Tehran Children's Medical Center Hospital. *Research in Medicine* 2018; 42(1): 59-63.
26. Rezai S, Peyravii Ghadikolaii F, Ahanjan M, Valadan R, Ahangarkani F, Ghara N. Prevalence of Nasal Carriage Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with *mecA* Gene among Healthy Primary School Boys in North of Iran; A Cross-Sectional Study. *Int J Pediatr* 2017; 5(12): 6515-6525.
 27. Bokaeian M, Zahedani SS, Por MS, Tahmasebi H, Adabi J. Study of antibiotic resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from samples of Ali Ebn Abi Talib hospital in 2014. *Medical J Tabriz Univ Med Sci Health Serv* 2018; 39(6): 12-20 (Persian).
 28. 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. *JSSU* 2015; 23(4): 2096-2108 (Persian)
 29. kadhoda H, ghalavand Z, Nikmanesh B, huori H, taghizadeh maleki D, eslami G. Virulence factors evaluation in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from children referred to Tehran Children's Medical Center Hospital. *Research in Medicine* 2018; 42(1): 59-64 (Persian).
 30. 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(1): 28-33.
 31. Parhizgari N, Khoramrooz SS, Malek Hosseini SAA, Marashifard M, Yazdanpanah M, Emameini M, et al. High frequency of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* with SCC mec type III and Spa types t037 and t631 isolated from burn patients in southwest of Iran. *Apmis* 2016; 124(3): 221-228.
 32. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Wilailuckana C, Kaewkes W, Vorachit M, et al. Preliminary report of SCCmec-types and antimicrobial susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a university hospital in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2010; 41(4): 920-927.
 33. Peng Q, Hou B, Zhou S, Huang Y, Hua D, Yao F, et al. *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 Microbiol Res* 2010; 4(9): 844-848.
 34. Moussa I, Hessian A. Rapid detection of community acquired-methicillin resistance *Staphylococcus aureus* recovered from King Saudi Arabia. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4(24): 2804-2810.
 35. Yao D, Yu FY, Qin ZQ, Chen C, He SS, Chen ZQ, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). *BMC Infect Dis* 2010; 10: 133.
 36. Mirzaei M, Emameini M, Jabalameli F, Halimi S, Taherikalani M. Molecular investigation of *Staphylococcus aureus* isolated from the patients, personnel, air and environment of an ICU in a hospital in Tehran. *Journal of Infection and Public Health* 2015; 8(2): 202-206.
 37. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Nasiri MJ, Goudarzi H, Nia RS, Dabiri H. Molecular

- characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from patients with bacteremia based on MLST, SCCmec, spa, and agr locus types analysis. *Microb Pathog* 2017; 104: 328-335.
38. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, 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 Microbiol* 2005; 43(10): 5026-5033.