ORIGINAL ARTICLE

Molecular Characterization and SCCmec Typing in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from the Staff in Zanjan Tertiary Hospitals

Laleh Mehrad[1],
Ali Ramazani[2],
Maryam Garshasbi[3]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Arak Science and Research Branch, Arak, Iran
[2] Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[3] MSc in Microbiology, Faculty of Basic Sciences and Medicine, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

(Received July 13, 2014 ; Accepted Jan 19 , 2015)

Abstract

Background and purpose: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates are the most common pathogen that causes hospital and community acquired infections. Studying on drug resistance, it is important strategy to prevent these types of infections. The use of molecular typing methods is essential for determining the origin of the strains and also in epidemiological investigations. The aim of present study was to survey the molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* (SA), to detect *mecA* gene, and typing SCC*mec* in the strains isolated from staffs in Vali-aser and Mousavi hospitals in Zanjan province.

Materials and methods: This descriptive study was carried out on 104 SA isolates collected from the clinical samples at Vali-aser and Mousavi hospitals. The identification of all tested isolates were confirmed by Gram's stain, coagulase and manitol salt agar and the isolates were tested for antibiotic resistance by the disc-diffusion method. In addition, the genotypes of SCC*mec* in the MRSA isolates were determined by multiplex PCR and the results were analyzed using the chi-square.

Results: The highest resistance was shown against oxacillin, penicillin, tetracyclin and co-trimoxazole and the most sensitive antibiotics were amikacin and ciprofloxacin and all of the isolates were sensitive to vancomycin and all of the isolates were resistant to at least three classes of antibiotics. Five (8.6%) MRSA strains were SCC*mec* type I, 11 (19%) were type II, 20 (34.5%) were type III, 17 (29.3) were type IV-a, 1 (1.7%) were type IV-b, 2(3.4%) were type IV-c, 11 (19%) were type IV-d and 18(31%) were type V. Overall, 19 (32.7%) MRSA strains could not be typed.

Conclusion: Our findings show that clinical isolates of MRSA in our hospital carrying various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCC*mec*) types. SCC*mec* typse III and V were the predominant strain of MRSA identified.

Keywords: methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), *mecA*, Antibiotic resistance, SCC *mec* Typing

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(121): 113-122 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۱ بهمن سال ۱۳۹۳ (۱۲۲-۱۱۳)

بررسی مولکولی و تعیین تایپ‌های SCCmec در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی سیلین جدا شده از پرسنل بیمارستان‌های آموزشی درمانی استان زنجان

لاله مهرد[1]
علی رمضانی[2]
مریم گرشاسبی[3]

چکیده

سابقه و هدف: ظهور سویه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، به عنوان یکی از عوامل بیماریزای مهم دخیل عفونت‌های بیمارستانی مورد توجه است. جمع‌آوری اطلاعات در مورد مقاومت دارویی این ارگانیسم، اقدامی مؤثر در جهت پیشگیری از این نوع عفونت‌ها محسوب می‌شود. هدف ازاین مطالعه تعیین خصوصیات مولکولی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه‌های بالینی و شناسایی ژن *mecA* و هم‌چنین تیپ‌بندی SCC*mec* درپرسنل بیمارستان‌های آموزشی درمانی استان زنجان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی، طی سال ۹۰، روی ۱۰۴ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از پرسنل بیمارستان‌های ولیعصر و آیت الله موسوی استان زنجان انجام پذیرفت. سویه‌ها با تست‌های بیوشیمیایی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، تخمیر قند مانیتول تأیید گردید و الگوی حساسیت و مقاومت به ۹ آنتی بیوتیک با روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. ژن *mecA* و ژنوتیپ SCC*mec* باروش مولتی‌پلکس PCR تعیین شد و نتایج با استفاده از آزمون مجذور کای تحلیل گردید.

یافته‌ها: ۵۸ مورد از۱۰۴ سویه دارای ژن *mecA* بود وبیش‌ترین مقاومت نسبت به اگزاسیلین، پنی‌سیلین، کوتریموکسازول و اریترومایسین مشاهده شد، حساسیت نسبت به آمیکاسین و سیپروفلوکساسین بیش‌ترین بود و همه سویه‌ها به ونکومایسین حساس بودند، همه سویه‌های MRSA حداقل به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند. ۵ سویه (۸/۶ درصد) دارای ژن typeI، ۱۱ سویه (۱۹ درصد) دارای ژن typeII، ۲۰ سویه (۳۴/۵ درصد) دارای ژن typeIII، ۱۷ سویه (۲۹/۳ درصد) دارای ژن typeIVa، ۱ سویه (۱/۷ درصد) دارای ژن typeIVb، ۲ سویه (۳/۴ درصد) دارای ژن typeIVc، ۱۱ سویه (۱۹ درصد) دارای ژن typeIVd، ۱۸ سویه (۳۱ درصد) دارای ژن typeV بودند، ۱۹ سویه (۳۲/۷ درصد) قابل تایپینگ نبودند.

استنتاج: یافته‌ها نشان داد که سویه‌های MRSA در نمونه های مورد مطالعه تایپ‌های مختلفی از SCC*mec* را حمل می‌کنند. تایپ‌های SCC*mec* نوع V و III غالب‌ترین تایپ‌ها بودند.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، *mecA*، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، تایپینگ مولکولی

مقدمه

استافیلوکوک‌ها (*Staphylococci*) یکی از گونه‌های های مهم و بیماری‌زای خانواده میکروکوکاسه می‌باشند. گروهی ازاستافیلوکوک‌ها، جزء فلور طبیعی پوست و مخاط هستند و گروهی مشکلات بسیار جدی

مولف مسئول: علی رمضانی-زنجان: گروه بیوتکنولوژی. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان E-mail: ramazania@zums.ac.ir
۱. کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات استان مرکزی، اراک، ایران
۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۴/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۶/۳۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۰/۲۹

را مانند: عفونت‌های پوستی و بافتی، آلودگی محل‌های جراحی شده، اندوکاردیت و آلودگی‌های باکتریایی اکتسابی بیمارستانی ایجاد می‌کنند. مقاومت استافیلوکوک‌ها در برابر عوامل ضد میکروبی در حال توسعه است و در حال حاضر مشکلات درمانی شدیدی را بوجود آورده است(۴-۱).

استافیلوکوکوس‌اورئوس، کوکسی گرم مثبت و کوآگولاز مثبت است که آن را از سایر گونه‌های استافیلوکوکی متمایز می‌سازد و مسئول ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌های کوچک پوستی تا اندوکاردیت، تهدیدکننده حیات انسانی است. استافیلوکوکوس‌اورئوس دامنه‌ی وسیعی از فاکتورهای بیماری‌زا را ایجاد می‌کند و می‌تواند باعث عفونت درمحل‌های آناتومیکی مختلف شود(۵-۳). این باکتری توانایی تطابق با محیط‌های گوناگون را دارد و به عنوان عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی در جهان و ایران مطرح است و قادر به تولید سموم پروتئینی و فاکتورهای بیماریزایی خارج سلولی مختلف است(۷،۶).

به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود توانائی بالا در تبادلات ژنتیکی و حضور انواع پلاسمیدهای مقاومتی، استافیلوکوک‌ها به عوامل آنتی میکروبی مقاومت نشان می‌دهند و مشکلات درمانی متعددی را پدید می‌آورند که از این بین به مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به متی‌سیلین (methicillin-resistant *staphyloccous aureus*:MRSA) بیش‌تر توجه شده است(۳،۴). استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها و آمینوگلیکوزیدها از خود نشان می‌دهد(۹،۸). مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به پنی‌سیلین، تولید بتالاکتاماز است که موجب هیدرولیز حلقه بتالاکتام و غیرفعال شدن پنی‌سیلین می‌شود. مکانیسم دیگر به پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی‌سیلین به نام PBP2a (penicillin-binding protein) مرتبط می‌شود که توسط ژن *mecA* کد می‌شود و با کاست بزرگ ژنی متحرک SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome). منتقل و در کروموزوم مقاوم قرار دارد(۹). درحال حاضر هشت تیپ اصلی SCC*mec* تیپ I تا VIII شناسایی شده است(۱۰) که دارای اندازه‌های متفاوتی بین ۲۱ تا ۶۷ کیلو باز می‌باشند: SCC*mec* تیپ I (۳۴/۳ کیلوباز)، IV (۲۰/۹ تا ۲۴/۳ کیلوباز)، V (۲۸ کیلوباز)، VI (۲۰/۹ کیلوباز) و VII(۳۵/۹ کیلوباز) فقط به بتالاکتام‌ها مقاوم‌اند، درصورتی‌که SCC*mec* تیپ II(۵۳ کیلوباز) و تیپ III(۶۷ کیلوباز) مقاومت به چندین کلاس آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهند(۱۳-۱۰). روش‌های تایپینگ و تحقیقات اپیدمیولوژیکی روی نمونه‌ها، تأثیر مهمی در تشخیص سویه‌های MRSA، منابع وکنترل انتشار این میکروارگانیسم‌ها خواهد داشت. تکنیک‌های فراوانی برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس به‌ویژه MRSA در دسترس می‌باشد. در گذشته نمونه‌ها توسط روش‌های فنوتیپی که شامل حساسیت به تست آنتی بیوتیکی بود، مشخص می‌شدند اما با پیشرفت بیولوژی مولکولی تایپینگ سویه‌ها بر DNA متمرکز گردید. این مطالعه باتوجه به اهمیت سویه‌های MRSA در جامعه و بیمارستان و عدم آگاهی نسبت به شیوع آن و به منظور تعیین خصوصیات مولکولی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس و شناسایی ژن *mecA* و هم‌چنین تیپ‌بندی SCC*mec* با استفاده از تکنیک مولتی پلکس PCR انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

آنالیز نمونه

۱۰۴ نمونه به طور تصادفی در طول سال ۹۰ از قسمت قدامی بینی پرسنل بیمارستان‌های آموزشی-درمانی آیت‌الله موسوی و ولیعصر زنجان جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در محیط انتقالی استوارت

(Stuart transfer medium Himedia, India) به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی زنجان فرستاده شد. نمونه‌ها جهت کشت در محیط مانیتول سالت‌آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از رشد کلنی تست‌های تکمیلی بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، کوآگولاز و تخمیر مانیتول انجام گردید(۱۴).

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (کایربی بوئر) و براساس استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد(۱۵) که در آن سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شده روی محیط مولر هینتون آگار کشت گردید، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل اگزاسیلین (۱میکروگرمی)، پنی‌سیلین(۱۰واحد)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرمی)، کوتریموکسازول ۱ میکروگرمی)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرمی)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرمی)، کلیندامایسین (۲ میکروگرمی)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرمی) و تتراسایکلین (۳۰ میکروگرمی) (پادتن طب، ایران) بودند که به فاصله ۲/۴ سانتی‌متر از یکدیگر (مرکز تا مرکزدیسک دیگر) روی محیط مورد نظر جاگذاری شده و بعداز ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون دردمای ۳۷ درجه، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید. از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۲۵۴۲۳ به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید(۱۷،۱۶).

استخراج DNA ژنومیک باکتری

برای استخراج DNA و انجام آزمایش PCR از روش جوشاندن استفاده گردید، بدین صورت که ابتدا چندکلنی تازه از محیط کشت حاوی MRSA خالص رادر ۲۰۰ میکرولیتر محلول لیز سلولی (شامل ۱درصد تریتون x-100، ۵ درصد توین ۲۰، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCL با pH=۸، ۱ میلی‌مولار) به شکل سوسپانسیون درآورده و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده و سپس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی DNA باکتری برای PCR استفاده شده و رسوب کنارگذاشته شد(۱۸).

جهت تائید درجه خلوص DNA در نمونه‌های استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (اپندورف، آلمان) استفاده شد. میزان خلوص DNA با نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نشان داده می‌شود. توالی پرایمرها و اندازه قطعات حاصل از تکثیر ژن‌های *mecA*،*SA442* و همچنین توالی پرایمر تحت تایپ‌ها در جداول شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است که از مقالات قبلی استخراج شده است(۱۹،۲۰). همچنین تحت تیپ‌های III,IVa, IVb, I, II, IVc, IVd, V بعد از چندین بار آزمایش، شرایط بهینه برای شناسایی آن‌ها به دست آمد که غلظت اپتیمم هر یک از مواد مورد استفاده در آزمایش ذکر شده است. سیکل حرارتی برای انجام آزمایش PCR برای ژن‌های *mecA* و *Sa442* روی کروموزوم باکتری در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. برای شناسایی تحت تیپ‌های I,II,III,IVa,IVb,IVc,IVd,V از روش مولتی پلکس PCR استفاده شد که ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده به ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR اضافه گردید. مخلوط واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس شامل(آنزیم Taq DNA Polymerase، سه میلی مول Mgcl2 و ۴۰۰ میکرومول از هر کدام از dNTPs)، ۵میکرولیتر پرایمرکه از مخلوط ۸ جفت پرایمر (F-R) تشکیل شده بود و ۲/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل می‌باشد تا درنهایت حجم مخلوط به ۲۵ میکرولیتر برسد. پروتکل دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر تحت تیپ‌ها I,II,III,IVa,IVb,IVc,IVd,V در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵

درصد الکتروفورز شد و باندها پس از رنگ‌آمیزی با سایبر گرین زیر تابش اشعه UV ظاهر شدند(۲۱، ۲۲). جهت تأیید توالی ژن‌های مورد نظر، محصولات PCR توسط شرکت Bioneer کره تعیین توالی شدند و توالی ژن‌ها بعد از اصلاح با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی (BLAST و Chromas version 2.01 ، GeneRunner version 3.05) در بانک ژنی ثبت شدند.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و اندازه قطعات حاصل از تکثیرژن‌های *Sa442* و *mecA* (۲۰)

نام پرایمر	توالی('5 to 3')	اندازه باند (bp)
Sa442-F	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	108
Sa442-R	CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA	
MecA-R	ATGGCTATCGTGTCACAATC	310
MecA-F	CTGGAACTTGTTGAGCAGAG	

جدول شماره۲: توالی پرایمر تحت تایپ‌ها و اندازه محصولات PCR(۲۰)

نام پرایمر	توالی	اندازه باند (bp)
Type I-F	5´- GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG -3´	613
Type I -R	3´-GTTCTCTCATAGTATGACGTCC-5	
Type II-F	5´--CGTTGAAGATGATGAAGCG-3´	398
Type II-R	3´-CGAAATCAATGGTTAATGGACC-5´	
Type III-F	5´-CCATATTGTACGATGCG-3´	280
Type III-R	3´-CCTTATTGTCGTAACAGATCG-5´	
Type IV a –F	5´-GCCTTATTCGAAGAAACCG-3´	776
Type IV a R	3´-CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG-5 ´	
Type IV b-F	5´-TCTGGAATTACTTCAGCTGC-3´	493
Type IV b-R	3´-AAACAATATTGCTCTCCCT-5´	
Type IV c-F	5´-ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC-3´	200
Type IV c-R	3´-TTGGTATGAGGTATTGCTGG-5´	
Type IV d-F	5´-CTCAAAATACGGACCCCAATACA-3´	881
Type IV d-R	3´-TGCTCCAGTAATTGCTAAAG-5´	
Type V-F	5´-GAACATTGTTACTTAAATGAGCG-3´	325
Type V-R	3´-TGAAAGTTGTACCCTTGACACC-5´	

جدول شماره۳: نحوه اجرای سیکل‌های PCR برای تشخیص ژن *Sa442* و *mecA*

مرحله	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	چرخه
واسرشت اولیه	۵ دقیقه	۹۵	۱ مرحله
واسرشت	۴۵ ثانیه	۹۴	۳۰ مرحله
اتصال	۴۰ ثانیه	۵۲	۳۰ مرحله
تکثیر	۳۰ ثانیه	۷۲	۳۰ مرحله
تکثیر نهایی	۷ دقیقه	۷۲	۱ مرحله

جدول شماره ۴: پروتکل دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر همزمان ژن‌های I,II,III,IVa,IVb,IVc,IVd,V استافیلوکوکوس‌اورئوس

مرحله	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	چرخه
واسرشت اولیه	۱۵ دقیقه	۹۴	۱ مرحله
واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴	۱۰ مرحله
اتصال	۱:۳۰ ثانیه	۶۰	۱۰ مرحله
تکثیر	۱:۳۰ ثانیه	۷۲	۱۰ مرحله
واسرشت نهایی	۴۵ ثانیه	۹۴	۲۵ مرحله
اتصال نهایی	۴۵ ثانیه	۵۵	۲۵ مرحله
تکثیر نهایی	۱:۳۰ ثانیه	۷۲	۲۵ مرحله

یافته ها

از بین ۱۰۴ نمونه ی مورد مطالعه ۵۸ مورد دارای ژن *mecA* بود و بیشترین مقاومت نسبت به اگزاسیلین، پنی سیلین، کوتریموکسازول و اریترومایسین مشاهده شد، حساسیت نسبت به آمیکاسین وسیپروفلوکساسین بیشترین بود و همه سویه‌ها به ونکومایسین حساس بودند، همه سویه‌های MRSA حداقل به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند(جدول شماره ۵).

جدول شماره ۵: میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

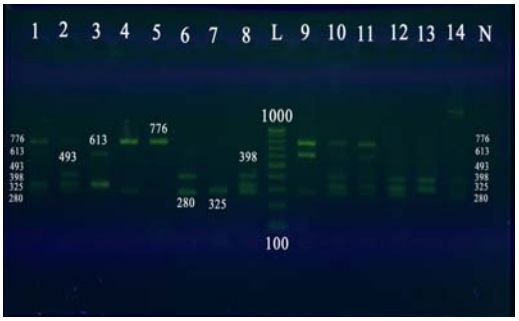
نام دارو	تعداد موارد مقاوم	درصد مقاومت
اگزاسیلین	۸۱	۷۷/۹
پنی‌سیلین	۷۸	۷۵
تتراسایکلین	۲۸	۲۶.۹
کوتریموکسازول	۲۰	۱۹/۲
ونکومایسین	۰	۰
کلیندامایسین	۲۹	۲۷/۹
اریترومایسین	۳۶	۳۴/۶
سیپروفلوکساسین	۵	۴.۸
آمیکاسین	۳	۲/۹
جمع کل نمونه‌ها	۱۰۴	۱۰۰

۵ سویه (۸/۶ درصد) دارای ژن typeI، ۱۱ سویه (۱۹ درصد) دارای ژن typeII، ۲۰ سویه (۳۴/۵ درصد) دارای ژن typeIII، ۱۷ سویه (۲۹/۳ درصد) دارای ژن typeIVa، ۱ سویه (۱/۷ درصد) دارای ژن typeIVb، ۲ سویه (۳/۴ درصد) دارای ژن typeIVc، ۱۱ سویه (۱۹ درصد) دارای ژن typeIVd، ۱۸ سویه (۳۱ درصد) دارای ژن typeV بودند و ۱۹ سویه (۳۲.۷ درصد) قابل تایپینگ نبودند (تصویر شماره ۱).

یافته‌های این مطالعه نشان داد که سویه‌های MRSA در بیمارستان‌های زنجان تایپ‌های مختلفی از SCC*mec* را حمل می‌کنند. تایپ‌های SCC*mec* نوع V و III غالب‌ترین تایپ‌ها بودند. برای تأیید و اعتبارسنجی توالی ژنی تایپ‌ها (Type I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd, V)، توسط شرکت BIONEER کره تعیین گردید و با نرم‌افزار chromass اصلاح گردید و در بانک ژنی ثبت گردید. نتایج توالی ژنی در بانک ژنی با شماره‌های

دسترسی زیر ثبت گردید. شماره دسترسی ژن‌ها در بانک ژنی (Accession number):

JX 142145- JX 142143 - JX 142141 – JX 142146 - JX142144- JX142142



تصویر شماره ۱: الگوی آمپلیفیکاسیون بدست آمده از تایپینگ SCC*mec* با استفاده از مولتی پلکس PCR، ۱: تایپ Iva,V، ۲: تایپ IVb,II,V، ۳: تایپ I,II، ۴: تایپ IVa,III، ۵: تایپ Iva، ۶: تایپ III,II، ۷: تایپ V، ۸: تایپ III,V,II، L: DNA ladder 100bp، ۹: تایپ IVa,III,I، ۱۰: تایپ Iva,III,V,I، ۱۱: تایپ IVa,III,I,V، ۱۲: تایپ III,V,II، ۱۳: تایپ V,II، ۱۴: تایپ V,II، N، نمونه کنترل منفی(فاقد DNA ژنومیک).

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یکی ازمهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی می باشد که در خلال چندین دهه گذشته از جمله عوامل اصلی ایجادکننده عفونت‌ها در سطح جامعه و بیمارستان بوده است. شناسایی و درمان سریع عفونت‌های ناشی از MRSA از اقدامات مهم در پیشگیری از گسترش عفونت و کاهش خطر مرگ و میر بیماران است. با توجه به اهمیت موضوع روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مختلفی جهت شناسایی MRSA در مناطق مختلف دنیا صورت گرفته است و در حال انجام است(۲۴،۲۳). این مطالعه بر روی ۱۰۴ نمونه به طور تصادفی از پرسنل بیمارستان‌های آموزشی درمانی آیت‌الله موسوی و ولیعصر زنجان جمع‌آوری شد و الگوی حساسیت و مقاومت به ۹ آنتی بیوتیک با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. ژن *Sa442* و *mecA* با روش PCR وژنوتیپ SCC*mec* با روش مولتی پلکس PCR تعیین گردید. که از بین نمونه‌ها در روش دیسک دیفیوژن ۸۱ سویه مقاوم به اگزاسیلین و ۵۸ مورد دارای ژن *mecA* بود. این نتیجه با نتایج مطالعه ی Tokueو Choiو همکاران قابل مقایسه است. Tokue بررسی کرد که از میان ۵۸ سویه استافیلوکوکوس اورئوس در روش فنوتیپی ۲۲ سویه مقاوم به اگزاسیلین و ۲۸ سویه حاوی ژن *mecA* بودند(۲۵) این در حالی است که در نتایج Choi، ۹۲ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده که ۶۱ نمونه MRSA بودند و در PCR، ۵۴ نمونه *mecA* مثبت گزارش شدند(۲۶)، در مطالعه‌ی دیگری که توسط زینعلی و همکاران انجام شده بود، همه سویه‌های MRSA جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی دارای ژن *mecA* بودند(۲۷). بیش‌ترین مقاومت نسبت به اگزاسیلین، پنی سیلین، کوتریموکسازول و اریترومایسین مشاهده شد، که این نتایج مشابه نتایج Moon و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بود(۲۸)، هم‌چنین در تحقیقی که توسط حسیبی انجام شده بود، از ۲۶ فردی که ناقل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی بوده‌اند، ۸ مورد MRSA مشاهده شده بود که ۷ نفر به اگزاسیلین مقاوم بودند و هیچ مقاومتی به ونکومایسین نشان نداده بودند(۲۹)، در مطالعه Thong، ۵۵ درصد از ۶۶ سویه به بیش از ۴ آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده ولی همه سویه‌ها به ونکومایسین حساس بودند(۳۰). یکسان نبودن نتایج ژن *mecA* با نتایج دیسک دیفیوژن می‌تواند به این دلایل باشد که مقاومت در سویه‌های MRSA از طریق ژن *mecA* به شکل ذاتی ایجاد نمی‌شود و همچنین موقعیت‌های جغرافیایی، جمعیت، روش و دلایل تکنیکی و کاربرد آنتی‌بیوتیک می‌تواند اثرگذار باشد(۳۱). خوشبختانه همه استافیلوکوکوس اورئوس‌های مورد بررسی در این تحقیق به ونکومایسین حساس بودند و این آنتی‌بیوتیک هنوز کارایی لازم برای درمان در بیمارستان‌ها را دارا است. به دلیل این که بیشترین شیوع MRSA ناشی از MRSA اکتسابی از جامعه (Community Associated-MRSA) است بنابراین

ردیابی انواع SCC*mec* در تعیین روند اپیدمیولوژیکی سویه‌های MRSA در تنظیمات بالینی مهم و ضروری است(۳۲). شایع‌ترین تحت تیپ‌های مشاهده شده در مطالعه حاضر نوع V و SCC*mec* III بودند که درمطالعه Tai و همکاران تیپ‌های غالب IV و SCC*mec* III مطرح شدند(۳۳) در تحقیق Thong و همکاران اغلب سویه‌ها مقاوم به چند دارو و دارای تیپ SCC*mec* III بودند(۲۹)، اما در مطالعه زینعلی و همکاران شایع‌ترین تیپ‌ها SCC*mec* type II و SCC*mec* type IV گزارش شده است و همچنین از ۸۷ سویه MRSA ۵۱ مورد آن غیر قابل تیپ بندی بودند(۲۷)، مواردی از غیر قابل تیپ بندی در مطالعات خارجی یافت شده است مانند کشور اسلوونی که از مجموعه ۳۱ سویه MRSA ۶ سویه آن غیر قابل تیپ‌بندی بودند(۳۰) همچنین در بیمارستان فلوریدا از ۱۱۳ ایزوله ۴ سویه آن در ردیف غیر قابل تیپ بندی قرار داشت(۳۴) و در مطالعه ما ۱۹ سویه از ۱۰۴ نمونه قابل تیپ‌بندی نبودند. ممکن است به حضور تیپ و تحت تیپ‌های ساختاری جدید یا بازآرایی ساختاری و نوترکیبی *mec* مرتبط باشد بنابراین تحقیقات بیش‌تری در زمینه توالی‌یابی *mec* به منظور مشخص کردن این ایزوله‌های غیرقابل تیپ‌بندی نیاز است(۳۳).

افزایش سال به سال این سویه‌ها چالش جدی را برای پزشکان و مدیریت کنترل عفونت‌های بیمارستانی ایجاد می‌کند علاوه بر آن در کشورهایی با شاخص بهداشتی و مراقبتی پایین، با درصد فزاینده سویه‌های MRSA در سطح جامعه و به خصوص بیمارستان مواجه هستیم. به همین منظور جهت پیشگیری از آلودگی‌های متقاطع، نیاز به سیستم‌های نظارتی موثری برای کنترل عفونت‌های ناشی از MRSA مقاوم به چند دارووجود دارد. از طرفی شیوع واقعی سویه های MRSA وابستگی زیادی به ناحیه جغرافیایی دارد بنابراین عاقلانه است که به دلیل تغییر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس بررسی‌های دوره‌ای این تغییرات انجام گیرد(۳۵).

به طور کلی نتایج این مطالعه میزان بالایی ازمقاومت به متی سیلین را در میان ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد. از این رو، به منظور انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان صحیح عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس و جلوگیری از بروز مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مؤثر باید از تجویز بدون نسخه و استفاده غیر ضروری از آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس خودداری کرد. تنوع بالای الگوهای ناحیه *mecA* مشاهده شده در این تحقیق می‌تواند به عنوان ابزاری مناسب در کنار سایر روش‌های مولکولی در دسته‌بندی این میکروارگانیسم، مورد استفاده قرارگیرد. استفاده از روش مولتی‌پلکس PCR از مزیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا با استفاده از این روش که تکنیکی سریع و قابل اعتماد است می‌تواند چندین ژن مقاومت را به‌طور هم‌زمان طی یک واکنش و کمتر از چند ساعت شناسایی کرد بنابراین جهت کنترل عفونت‌های کسب شده از بیمارستان وجامعه حائز اهمیت می‌باشد.

سپاسگزاری

از همکاران محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و بیمارستان ولیعصر و وآیت الله موسوی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Abdel-moein K, El-Hariri M, Samir A. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: An Emerging Pathogen of Pets in Egypt with a Public Health Burden. Transbound Emerg Dis 2012; 59(4): 331-335.
2. Saha B, Singh AK, Ghosh A, Bal M. Identification and characterization of a

vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolated from Kolkata (South Asia). J Med Microbiol 2008; 57(1): 72-79.

3. Casey AL, Lambert PA, Elliott T. Staphylococci. Int J Antimicrob Agents 2007; 29(supp3): S23-S32.
4. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg E. Review of medical microbiology. 14th ed. Appleton & Lange; 1980.
5. Tiwari HK, Das AK, Sapkota D, Sivrajan K, Pahwa VK. Methicillin resistant Staphylococcus aureus: prevalence and antibiogram in a tertiary care hospital in western Nepal. J Infect Dev Ctries 2009; 3(9): 681-684.
6. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. New Engl J Med 1998; 339(8): 520-532.
7. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M. Prophage typing of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur J Microbiology 2013; 6(1): 80-85.
8. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infec 2001; 3(7): 585-594.
9. Warsa UC, Okubo T, Okamoto R. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of Staphylococcus aureus clinical isolates in Indonesia. Journal of Infection and Chemotherapy 1996; 2(1): 29-33.
10. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemothe 2001; 45(5): 1323-1336.
11. Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany Sh, Saito K. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(3): 837-845.
12. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 2002; 359(9320): 1819-1827.
13. Dufour P, Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. Clin Infect Dis 2002; 35(7): 819-824.
14. Güler I, Kılıç H, Atalay MA, Perçin D, Erçal BD. Genotyping of nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens by rep-PCR]. Mikrobiyol Bul 2011; 45(4): 581-591.
15. Tenover FC, Moellering RC. The Rationale for Revising the Clinical and Laboratory Standards Institute Vancomycin Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Criteria for Staphylococcus aureus. Clin Infec Dis 2007; 44(9): 1208-1215.
16. Lee J, Sung JY, Kim YM, Oh CE, Kim HB, Choi EH. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus obtained from the anterior nares of healthy Korean children attending daycare centers. Int J Infect Dis 2011; 15(8): e558-e563.
17. Leonhardt KK, Yakusheva O, Phelan D, Reeths A, Hosterman T, Bonin D. Clinical effectiveness and cost benefit of universal versus targeted methicillin-resistant Staphylococcus aureus screening upon

admission in hospitals. Infec Control Hosp Epidemiol 2011; 32(8): 797-803.

18. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistantStaphylococcus aureus and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence *PCR*. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2429-2433.
19. Makgotlho PE, Kock MM, Hoosen A, Lekalakala R, Omar S, Dove M. Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 57(2): 104-115.
20. Haseli M, Ramazani A, Khaleghi Khorram A, Mehrad L. Specific Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Journal of Isfahan Medical School 2013; 30(213): 1892-1900.
21. Fosheim G, Nicholson AC, Albrecht VS, Limbago BM. Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and associated toxin genes. J Clin Microbiol 2011; 49(8): 3071-3073.
22. Hirvonen JJ, Nevalainen M, Tissari P, Salmenlinna S, Rantakokko-Jalava K, Kaukoranta SS. Rapid confirmation of suspected methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonies on chromogenic agars by a new commercial PCR assay, the GenomEra MRSA/SA Diagnose. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(8): 1961-1968.
23. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56(6): 1000-1018.
24. Cabral K, Lämmler C, Zschöck M, Langoni H, de Sá ME, Victória C, et al. Pheno-and genotyping of Staphylococcus aureus, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. Can J Microbiol 2004; 50(11): 901-909.
25. Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomiya M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36(1): 6-9.
26. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, et al. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. J Korean Med Sci 2003; 18(5): 631-636.
27. Zeinali E, Moniri R, Mousavi G. Molecular characterization and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in Tertiary Care Hospital, Kashan. ZUMS Journal 2012; 19(77): 31-40.
28. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, et al. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. J Dairy Sci 2007; 90(3): 1176-1185.
29. Hasibi M, Iravani BM. Prevalence of Methicillin and Vancomycin resistant Staphylococcus aureus colonization in nasopharynx; Amir-Alam hospital, 2005. Tehran Univ Med J 2007; 65(3): 78-81.
30. Thong KL, Junnie J, Liew FY, Yusof MY, Hanifah YA. Antibiograms and molecular subtypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in local teaching hospital, Malaysia. J Microbiol Biotechnol 2009; 19(10): 1265-1270.
31. Bignardi G, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC. Detection of the

mec-A gene and phenotypic detection of resistance in Staphylococcus aureus isolates with borderline or low-level methicillin resistance. J Antimicrob Chemother 1996; 37(1): 53-63.

32. Hartman B, Tomasz A. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19(5): 726-735.
33. Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bloodstream isolates from a teaching hospital in Northern Taiwan. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 2268-2270.
34. 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.
35. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 1998; 36(3): 618-623.