# تایپینگ مولکولی کاست کروموزومی SCCmec در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین


- **پروانه عطائی‌فر:** گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران
- **فاطمه نوربخش*:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران
- **شهره زارع‌کاریزی:** گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران


تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۶

## چکیده

**\استافیلوکوکوس \اورئوس یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در عفونت‌های بیمارستانی و خارج بیمارستانی می‌باشد. افزایش مقاومت \استافیلوکوکوس \اورئوس به داروهای آنتی‌بیوتیک یکی از معضلات مهم در درمان بیماران است و به این ترتیب مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی \استافیلوکوکوس \اورئوس بسیار مهم است. هدف از این مطالعه تایپینگ مولکولی کاست کروموزومی ژن SCCmec در سویه‌های \استافیلوکوکوس \اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد. در این مطالعه ۱۰۶ ایزوله بالینی \استافیلوکوکوس \اورئوس از نمونه‌های بالینی بستری در بیمارستان میلاد تهران جمع‌آوری شدند و با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله \استافیلوکوکوس \اورئوس به ۲ آنتی بیوتیک اگزاسیلین و سفوکسیتین از طریق روش دیسک دیفیوژن براساس پروتکل CLSI 2015 مورد برسی قرار گرفت. استخراج ژنومی تمامی ایزوله‌ها با روش جوشاندن انجام شد و SCCmec typing با روش PCR و multiplex PCR انجام شد. از مجموع ۱۰۶ ایزوله \استافیلوکوکوس ۵۰ ایزوله (۴۷/۱۶٪) MRSA بودند. PCR و تایپینگ نشان داد که تایپ *I* ۱۱ مورد (۲۲٪)، تایپ *II* ۲۰ مورد (۴۰٪)، تایپ *III* ۲۸ مورد (۵۶٪)، تایپ *IVa* ۷ مورد (۱۴٪)، تایپ *IVb* ۵ مورد (۱۰٪)، تایپ IVc ۱۲ مورد (۲۴٪)، تایپV ۹ مورد (۱۸٪) وتایپ IVd در هیچ نمونه‌ای یافت نشد. تایپ‌های مختلف SCCmec وابستگی‌هایی به محل جداسازی سویه‌ها دارد و تفاوت‌هایی در نوع و میزان شدت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دارد، در این مطالعه تایپ *IVa* کم‌ترین تایپ SCCmec بود و بیش‌ترین تایپ شناسایی شده در این تحقیق مربوط به تایپ III و II بود که این تایپ عمدتاً ایجاد سویه‌هایی می‌کند که عامل بروز مقاومت‌های چندگانه دارویی است.**

**کلمات کلیدی:** استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین، MRSA، تایپینگ مولکولی، SCCmec



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

## مقدمه

*استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای باکتریال در انسان و حیوانات محسوب می‌شود که سال‌ها است عفونت‌های منشا گرفته از جامعه (Community acquired) و منشاء گرفته‌ازبیمارستان(Hospital Acquired)را پدید می‌آورد. این باکتری می‌تواندمنجربه‌بروزعفونت‌های‌مختلفی ازجمله سپتی‌سمی، پنومونی، سپسیس زخم، آرتریت سپتیک، استئومیلیت، سندروم شوک سمی پس از اعمال جراحی، فولیکولیت، کورک، کفکیرک، آبسه، مسمومیت غذایی، باکتریمی، اندوکاردیت و عفونت مجرای ادراری (UTI یا Urinary Tract Infection) در بیماران شود (Mahon و همکاران، ۲۰۰۷). ایزوله‌های منشا گرفته از جامعه، عمدتاً حساس به داروها هستند و شیوع عفونت های تهاجمی در این سویه‌ها بیش‌تر گزارش شده است (Da silva و همکاران، ۲۰۰۶). به‌دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود توانایی بالا در تبادلات ژنتیکی و حضور انواع پلاسمیدهای‌مقاومتی،استافیلوکوک‌ها به‌عوامل آنتی‌میکروبی مقاومت نشان می‌دهند و مشکلات درمانی متعددی را پدید می‌آورند که از این بین به مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به متی‌سیلین (MRSA یا Methicillin resistant staphyloccous aureus)بیش‌تر توجه‌شده‌است (Casey و همکاران، ۲۰۰۷). *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به بتالاکتام، ماکرولید ها و امینوگلیکوزیدها از خود نشان می‌دهد (Novick و همکاران، ۲۰۰۱؛ Warsa و همکاران، ۱۹۹۶). مهم‌ترین مکانسیم مقاومت به پنی‌سیلین، تولید بتالاکتاماز است که موجب هیدرولیز حلقه‌بتالاکتام‌و غیرفعال شدن پنی‌سیلین می‌شود (Moon و همکاران، ۲۰۰۷). امروزه افزایش مقاومت استافیلوکوک‌ها به داروهای بتالاکتام مشکلات‌فراوانی را در درمان‌عفونت‌های‌مربوطه‌به‌وجود آورده است (Moon و همکاران، ۲۰۰۷). یکی از عوامل موفقیت این پاتوژن در بروز بیماری‌های‌انسانی، توانایی آن‌در به‌وجود آوردن‌تایپ‌های مختلف و نیز کسب الگوهای مقاومت متنوع در مناطق جغرافیایی گوناگون است (Noto و همکاران، ۲۰۰۶). باتوجه به اهمیت استفاده از تایپینگ مولکولی‌در بیمارستان‌ها جلوی‌شیوع‌بسیاری‌ازعفونت‌های بیمارستانی گرفته می‌شود و از این نظر به اقتصاد و سلامت جوامع مختلف کمک شایانی‌می‌گردد(Nasonova، ۲۰۰۸).اطلاعات‌ژنتیکی‌مربوط‌به‌مقاومت به متی‌سیلین در ژن mecA قرار دارد که خود نوعی پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین به‌نام PBP2a را کدمی‌کند (Momtaz و همکاران، ۲۰۱۱). ژن mecA قطعه‌ای به‌اندازه ۲/۱ کیلوباز است که در ناحیه متحرک ژنومیک به‌نام SCCmecA قرار دارد. در حال حاضر هفت تیپ اصلیSCCmec (تیپ I تا VII) شناسایی شده است (Ito و همکاران، ۲۰۰۱)، که دارای اندازه‌های متفاوتی بین ۲۰/۹ تا ۶۶/۹ کیلوباز می‌باشند. SCCmec 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 بتالاکتام مقاومند، درصورتی‌که SCCmec تیپ II (۵۳ کیلوباز) و تیپ III (۶۶/۹ کیلوباز)، مقاومت به چندین کلاس آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهند(Takanoو همکاران، ۲۰۰۸؛Ito و همکاران، ۲۰۰۳؛ Ito و همکاران، ۲۰۰۱). تکنیک‌های مولکولی که برای تایپینگ میکروب‌ها به‌کار می‌روند عبارتند از: (ژل الکتروفورز در میدان ضربانی) PFGE، روش‌های متکی بر برش آنزیمی، آنالیز پلاسمیدها و روش‌های تیپ بندی براساس PCR است (Hwwari و همکاران، ۱۹۹۸). آنتی‌بیوگرام، یکی از ابزارهای مهم تایپینگ در بسیاری از بیمارستان‌ها محسوب می‌شود چون انجام آن به آسانی مقدور است و به‌راحتی قابل استاندارد سازی می‌باشد (Ishino و همکاران، ۲۰۰۷). هدف از این مطالعه با توجه به اهمیت سویه‌های MRSA در جامعه و بیمارستان به‌منظور تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های بالینی،تیپ‌بندی sccmecبا استفاده از تکنیک PCR و multiplex PCR انجام پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

**الف) نمونه‌برداری**: این مطالعه توصیفی بر روی ۱۰۶ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی شامل خون، زخم، ادرار، بینی، تراشه‌وخلط از بیماران بیمارستان میلاد تهران انجام پذیرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه تحقیقاتی بیمارستان بقیه الله تهران منتقل شد. نمونه‌های بیماران بر روی محیط‌های کشت نوترینت آگار و آگار خون‌دار در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند، سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم کوکسی‌های گرم مثبت جدا شده و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کوآگولاز، مانیتول سالت آگار، رشد در نمک ۶/۵٪ و تست نوبیوسین شناسایی شدند.

**ب) آزمون حساسیت میکروبی:** در این مطالعه حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*باروش انتشار دیسک نسبت به ۲ آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین و سفوکسیتین ۳۰ میکروگرمی تهیه شده از شرکت (اندیشه طب ایران) و مطابق با معیار CLSI 2015 تعیین گردید(Tenover و Moellering، ۲۰۰۷).سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵۹۲۳ ATCC به‌عنوان شاهد آزمایش استفاده شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت حساس، نیمه‌حساس و مقاوم گزارش گردید.

**ج) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR):** ابتدا سویه‌های *استافیلوکوکوس* مقاوم به متی‌سیلین به‌صورت انبوه در محیط نوترینت آگار به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. سپس برای استخراج DNAاز روش جوشاندن استفاده شد. به‌منظور شناسایی ژن‌های SCCmec type (I,II, III, V) با استفاده از PCR انجام شد و شناسایی ژن‌های SCCmec type( Iva, IVb, IVc, IVd) با روش PCR multiplexانجام‌پذیرفت، که بدین‌منظور (۱۰-۱۰۰۰ng) ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس PCR که شامل (۱ واحد آنزیم Taq DNA polymeras، سه میلی‌مول $Mgcl_2$ و ۴۰۰ میکرومول از هر کدام از dNTPs) با ۱میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای Forward, Revers با غلظت ۱۰میکرومول با ۹/۵ میکرولیتر از آب مقطر دیونیزه مخلوط گردید. در این بررسی از ۹ جفت پرایمر استفاده گردید. ابتدا توالی ژن‌های مورد نظر استخراج ( Ghaznavi Rad و همکاران، ۲۰۱۰) در ادامه میزان اختصاصی بودن پرایمرها با استفاده از Primer-blast با آدرس اینترنتی ( http://www.ncbi.gov/ tools/primer-blast) مورد ارزیابی قرار گرفت و به‌منظور آنالیز جهت اطمینان از ساختارهای ثانویه از نرم‌افزار oligo analyzer استفاده شد. توالی‌های پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

**جدول ۱: مشخصات پرایمرهای اختصاصی تایپ‌های SCCmec**

| primer | Primer sequence(۵'→۳') | Target gene | (bp) Size |
|---|---|---|---|
| Type I | GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG<br>GTTCTCTCATAGTATGACGTCC | ORF E008 of strain NCT C10442 | ۶۱۳ |
| Type II | GATTACTTCAGAACCAGGTCAT<br>TAAACTGTGTCACACGATCCAT | kdpE of strain N315 | ۲۸۷ |
| Type III | CATTTGTGAAACACAGTACG<br>GTTATTGAGACTCCTAAAGC | J1 region of SCCmec Type III | ۲۴۳ |
| Type Iva | GCCTTATTCGAAGAAACCG<br>CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG | ORF CQ002 of strain CA05 | ۷۷۶ |
| Type IVb | AGTACATTTTATCTTTGCGTA<br>AGTCATCTTCAATATGGAGAAAGTA | J1 region of SCCmec type IVb | ۹۹۴ |
| Type IVc | TCTATTCAATCGTTCTCGTATT<br>TCGTTGTCATTTAATTCTGAACT | IVc element of strain 81/108 | ۶۷۷ |
| Type IVd | AATTCACCCGTACCTGAGAA<br>AGAATGTGGTTATAAGATAGCTA | CD002 in type IVd | ۱۲۴۲ |
| Type V | GAACATTGTTACTTAAATGAGCG<br>TGAAAGTTGTACCCTTGACACC | ORF V011 of strain JCSC3624 | ۳۲۵ |

برنامه زمانی PCR برای ژن‌های SCCmec type I, II, III, V شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال برای ژن‌های type (I, II, III, V) به‌ترتیب شامل (۵۵/۷، ۵۴/۹، ۵۸، ۵۸/۷)به‌مدت ۱ دقیقه، طویل‌شدن در ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸ دقیقه انجام پذیرفت. دمای اتصال برای واکنش multiplex PCR برای ژن‌های SCCmec type (Iva,IVb, IVc, IVd) ۵۹ درجه سانتی گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه درنظر گرفته شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل ۱/۵ درصد آگارز به‌مدت ۷۵ دقیقه در ۹۰ ولت صورت گرفت. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام شده و نتایج توسط دستگاه Transluminatorمشاهده‌شد.هم‌چنین از مارکر Kb ۳+۱۰۰bp برای تایید وزن مولکولی محصولات PCR استفاده گردید.

**د) آنالیز آماری:** اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار Excel برای تعیین فراوانی تایپ‌های SCCmec ایجادکننده مقاومت به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

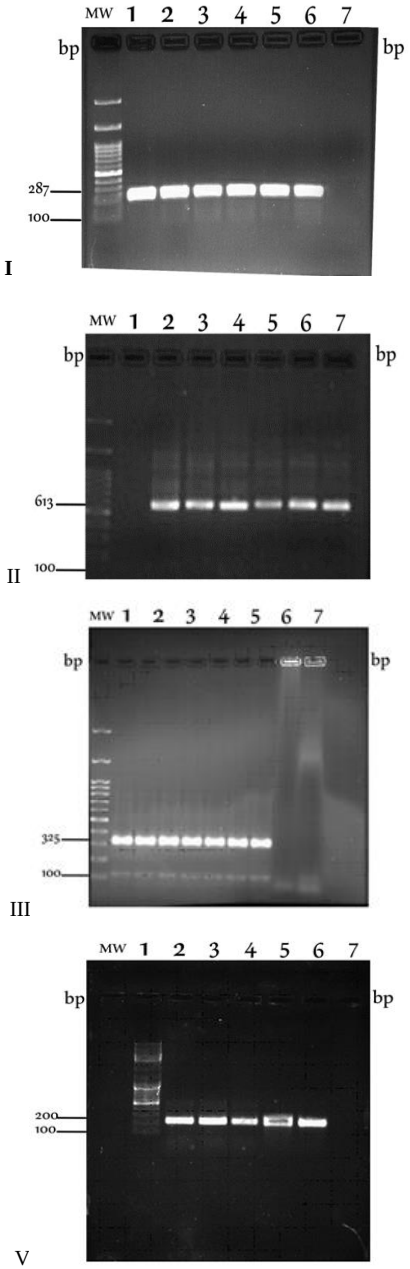
## نتایج

میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۴۵ سال و از حداقل ۱۵ تا حداکثر ۷۵ سال متغیر بود. ۴۵ سویه از نمونه‌های مردان (۴۲/۴۵ درصد) و ۶۱ سویه (۵۷/۵۴ درصد) از نمونه‌های زنان جدا شده بود. ۳۲ نمونه (۳۰/۱۸ درصد) ادرار، ۱۸ نمونه (۱۶/۹۸درصد) خون، ۲۱ نمونه (۱۹/۸۱درصد) زخم، ۱۵نمونه (۱۴/۱۵درصد) تراشه، ۹ نمونه (۸/۴۹ درصد) بینی، ۱۱ نمونه (۱۰/۳۷ درصد) خلط بود. در جدول ۲ درصد فراوانی ژن‌ها در هریک از نمونه‌های بالینی بیان شده است.

**نتایج تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها:** در این مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۰۶ سویه نسبت به ۲ آنتی‌بیوتیک شامل سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و اگزاسیلین (۳۰ میکروگرم) تعیین گردید، که ۵۰ سویه به هر دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده و ۵۶ سویه حساس بودند.

**نتایج PCR جهت شناسایی ژن‌های SCCmec type ( I,II, III, V):** پس از انجام تست‌های تعیین حساسیت میکروبی سویه‌های استافیلوکوک MRSA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های SCCmectype (I, II, III, V ) تکثیر شدند که باندی به‌اندازه

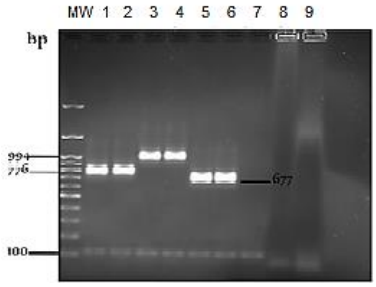
به‌ترتیب (۳۲۵bp، ۲۰۰ bp، ۲۸۷ bp، ۶۱۳ bp) ایجاد کردند که در شکل ۱ قابل مشاهده است.




**شکل ۱: I : تکثیر ژن SCCme type I در *استافیلوکوکوس اورئوس***

۱: کنترل منفی و MW: مارکر ۱۰۰bp+۳ Kb، II: تکثیر ژن SCCmec type II در *استافیلوکوکوس اورئوس* ۷: کنترل منفی و MW: مارکر ،III : تکثیر ژن SCCmec type III در *استافیلوکوکوس اورئوس* ۷: کنترل منفی و MW: مارکر، تکثیر ژن SCCmec type V در *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۶، ۷ :کنترل منفی و MW : مارکر

**نتایج Multiplex PCR جهت شناسایی ژن‌های SCCmec type IV:** پس‌از انجام تست‌های تعیین حساسیت میکروبی سویه‌های استافیلوکوک MRSA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۱. ژن SCCmec Type IVa تکثیر شد که باندی به‌اندازه ۷۷۶ bp ایجاد کرد. ۲. ژن SCCmec type IVb تکثیر شد که باندی به‌اندازه ۹۹۴ bp ایجاد کرد. ۳. ژن SCCmec Type IVc تکثیر شد که باندی به‌اندازه ۶۷۷bp ایجاد کرد. ۴. لازم به‌ذکر است که SCCmec Type IVb باندی ایجاد نکرد که در شکل ۲ قابل مشاهده است.




**شکل ۲: تکثیر ژن SCCmec type IV در *استافیلوکوکوس اورئوس***

MW : مارکر ۱۰۰ bp+ ۳kb، ۲-۱: نمونه‌های ژن type IVa ، ۴-۳: نمونه‌های ژن type IVc ، ۶-۵: نمونه‌های ژن type IVc ، ۸-۷: نمونه‌های ژن type IVd و ۹: کنترل منفی

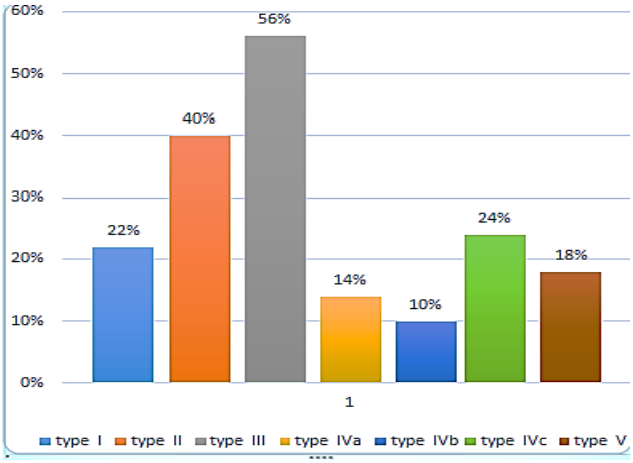
**فراوانی هریک از ژن‌هادرهر نمونه بالینی:** پس از انجام PCR برای تایپ‌های مختلف SCCmec، تایپ‌های مقاوم به متی‌سیلین در باکتری‌های جداشده از نمونه‌های بالینی مختلف تعیین شد که در جدول ۲ آمده است.

**نتایج مربوط به فراوانی کاست کروموزومی SCCmec *استافیلوکوک اورئوس*های مقاوم‌به‌متی‌سیلین:** بررسی ایزوله‌های ۵۰سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم‌به‌متی‌سیلین که توسط تکنیک PCR انجام گردید نشان داد که تعداد (۵۶٪) ۲۸ مورد از ایزوله‌ها متعلق به SCCmecType III، تعداد(۴۰٪) ۲۰مورد از ایزوله‌ها متعلق به SCCmecType II، تعداد (۲۴٪) ۱۲ مورد از ایزوله‌ها متعلق به SCCmecType IVc، (۲۲٪) ۱۱ مورد از ایزوله‌ها متعلق به SCCmecType I، تعداد (۱۸ ٪) ۹ مورد از ایزوله‌ها مربوط به SCCmecTypeV،(۱۴٪)۷مورداز ایزوله‌ها مربوط به SCCmecType Iva وتعداد (۱۰٪) ۵ مورد از ایزوله‌ها مربوط به SCCmecType IVb می‌باشد (شکل ۳).

**هم‌زمانی ۳ تایپ ایجادکننده مقاومت به متی‌سیلین:** در *استافیلوکوک اورئوس*های مقاوم به متی‌سیلین که دارای تایپ‌های مختلف کاست کروموزومیSCCmec بودند، وجود هم‌زمان تایپ‌های مختلف در یک باکتری بررسی شد. در این مورد دو تایپ (I–II) با سایر تایپ‌ها به‌صورت هم‌زمان وجود نداشتند و بیش‌ترین هم‌زمانی مربوط به تایپ II- III مشاهده شد. در این مطالعه فقط در یک باکتری به‌طور هم‌زمان دارای ۴تایپ type II، type III، type IVb، type V بود و در هیچ موردی ۵، ۶، ۷، ۸ تایپ با هم مشاهده نگردید.

**جدول ۲: فراوانی ژن‌ها در هر یک از نمونه‌های بالینی**

| ژن‌های مورد مطالعه | ادرار | خون | زخم | خلط | بینی | تراشه |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SCCmec type I | ٪ ۱۰ (۵) | ٪۴(۲) | ٪۲ (۴) | ٪۲ (۱) | ٪۴ (۲) | ٪۰ |
| SCCmec type II | ٪۲۰(۱۰) | ٪۱۶(۸) | ٪۰ | ٪۴ (۲) | ٪۰ | ٪۰ |
| SCCmec type III | ٪۱۴(۷) | ٪۱۲(۶) | ٪۸ (۴) | ٪۸ (۴) | ٪۶ (۳) | ٪۸ (۴) |
| SCCmec type IVa | ٪۶ (۳) | ٪۲(۴) | ٪۴ (۲) | ٪۲ (۱) | ٪۰ | ٪۰ |
| SCCmec type IVb | ٪۰ (۰) | ٪۰ | ٪۴ (۲) | ٪۰ | ٪۶ (۳) | ٪۰ |
| SCCmec type IVc | ٪۴ (۲) | ٪۰ | ٪۱۸ (۹) | ٪۰ | ٪۰ | ٪۴ (۲) |
| SCCmec type IVd | ٪۰(۰) | ٪۰ | ٪۰ | ٪۰ | ٪۰ | ٪۰ |
| SCCmec type V | ٪۸ (۴) | ٪۰ | ٪۲ (۱) | ٪۰ | ٪۸ (۴) | ٪۰ |




**شکل ۳: نمودار فراوانی تایپ‌های SCCmec *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین**

**جدول ۳: وجود هم‌زمان سه تایپ SCCmec Type در یک باکتری**

| | |
|---|---|
| SCCmec Type I +SCCmec Type III + SCCmec Type Iva | ٪۲ |
| SCCmec Type I +SCCmec Type III + SCCmec Type V | ٪۲ |
| SCCmec Type I +SCCmec Type Iva + SCCmec Type V | ٪۲ |
| SCCmec Type II +SCCmec Type III + SCCmec TypeIVa | ٪۴ |
| SCCmec Type II +SCCmec Type III + SCCmec Type IVc | ٪۸ |
| SCCmec Type II +SCCmec Type III + SCCmec Type V | ٪۲ |
| SCCmec Type III +SCCmec Type IVa + SCCmec Type V | ٪۴ |
| SCCmec Type III +SCCmec Type IVb + SCCmec Type V | ٪۲ |

## بحث

شیوع روزافزون عفونت‌های ناشی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، پیشگیری از بروز این عفونت‌ها و ردیابی کانون انتشار باکتری در بیمارستان‌ها را ضروری کرده است (Boucher و همکاران، ۲۰۱۰). در تحقیق حاضر مقاومت دارویی و تایپینگ ژن SCCmec در سویه‌های MRSA مورد بررسی قرار گرفت. طبق بررسی حاضر از میان ۱۰۶ نمونه *استاف اورئوس* بیش‌ترین مقاومت بین ۵۰ سویه نسبت به اگزاسیلین و سفوکسیتین مشاهده گردید.

براساس نتایج به‌دست آمده از SCCmec در این مطالعه بیش‌ترین میزان تایپ‌های مختلف به‌ترتیب مربوط به تایپ III (۲۸ مورد)، II (۲۰ مورد)، IVc (۱۲ مورد)، I (۱۱ مورد)، v (۹ مورد)، Iva (۷ مورد)، IVb (۵ مورد)، IVd (۰ مورد) بود. در این مطالعه نمونه‌ها از بیماران بستری در بیمارستان گرفته شد و همه سویه‌ها قابل تایپ بودند و سویه مولتی باند IV (Iva ,IVb, IVc ) مشاهده گردید. بیش‌ترین تایپ شناسایی شده در این تحقیق مربوط به تایپ III و II بود که این تایپ عمدتاً ایجاد سویه‌هایی می‌کند که عامل بروز مقاومت‌های چندگانه دارویی است (Ito و همکاران، ۲۰۰۳)، که باعث دو چندان شدن مشکلات درمانی به‌خصوص در بخش‌های بیمارستانی می‌شود. مقایسه نتایج به‌دست آمده از این مطالعات با سایر مطالعات نشان می‌دهد شیوع MRSA در مناطق مختلف، متفاوت می‌باشد.

Reza Zadeh و همکاران (۲۰۱۴) در مقایسه دو روش دیفیوژن و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نشان داد که از ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان، تعداد ۷۵ نمونه (۷۵ درصد) به‌روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، نسبت به اگزاسیلین مقاوم بود که نتایج مشابه با مطالعه اخیر نبود.

مطالعه‌ای که به‌وسیله Amiri و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی خصوصیات مولکولی و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در کاشان انجام گرفت مشاهده کردند از ۱۵۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۸۷ سویه مقاوم به متی‌سیلین (۵۸ درصد) دارای ژن mecA بودند که از این تعداد ۳ سویه دارای ژن SCCmec Type I، ۱۲ سویه SCCmec Type II، ۸ سویه SCCmec Type IVb، ۴ سویه SCCmec Type IVd و ۳ سویه SCCmec Type V

بودند و از یافته‌های این مطالعه به این نتیجه رسیدند که سویه‌های MRSA در بیمارستان کاشان تایپ‌های مختلفی از SCCmec را حمل می‌کند و دو تایپ غالب SCCmec در این مطالعه تایپ II، IV بودند. در این مطالعه مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی ۵۰ درصد است، فراوانی MRSA در گزارش Rahbar و همکاران (۲۰۰۶) از تهران ۵۳ درصد، Fatholahzadeh و همکاران (۲۰۰۸) از تهران ۳۶ درصد و از بیمارستان نمازی شیراز، ۴۳ درصد است (Japoni و همکاران، ۲۰۰۴). در کشور ترکیه نیز MRSAها ۵۱ درصد گزارش شده است (Adaleti و همکاران، ۲۰۰۸).

در بررسی مقاومت دارویی و ژنوتیپ کاست کروموزومی mec استافیلوکوکسی (SCCmec) در سویه‌های *استاف اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین توسط Abdollahi و همکاران (۲۰۱۲) در شهر فسا انجام گرفت مشاهده کردند از ۶۴ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۷۸ سویه (۴۷/۵۶ درصد) MRSA شناسایی گردید که از میان این موارد مقاوم ۱۵ مورد مربوط به تایپ‌های I ، IV ، V و ۶۳ مورد مربوط به تایپ‌های II و III بودند که بیش‌ترین میزان تایپ‌های مختلف به‌ترتیب مربوط به تایپ‌های II (۳۴ مورد)، III (۲۹ مورد)، I (۶ مورد)، V (۶ مورد) و IV (۳ مورد) بوده است. در کشور مالزی از ۶۶ سویه MRSA تنها ۲ تیپ مشاهده شده است که ۵۲ سویه (۷۸/۸٪) SCCmec Type III و ۱۲ سویه(۱۸/۱۸٪) SCCmec Type II بوده است (Thong و همکاران، ۲۰۰۹) که مشابه نتایج به‌دست آمده در این مطالعه بیش‌ترین تایپ‌ها II و III بودند.

مطالعه Chung و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که شایع‌ترین نوع mecA در ۸ کشور آسیایی SCCmec Type III بوده است. در کشور مالزی از مجموع ۳۱ سویه MRSA ۱۶ سویه (۵۱/۶٪) SCCmec Type IV، ۷ سویه (۲۲/۵٪) SCCmec Type I، ۲ سویه (۶/۵٪) SCCmec Type III و ۶ سویه (۱۹/۴٪) غیرقابل تایپ‌بندی بودند (Thong و همکاران، ۲۰۰۹).

نتایج حاصل از مطالعه انجام شده در کشور بنگلادش نشان داد که ۹۲/۳ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین دارای SCCmec تیپ ۳، ۷/۷ ٪ سویه‌ها دارای SCCmec تیپ ۲ در ژاپن و کره جنوبی بیش‌تر شایع است. درحالی‌که SCCmec تیپ ۳ در بعضی از کشورهای آسیایی مانند عربستان صعودی، هند، سریلانکا، سنگاپور، چین و تایلند شیوع دارد. در کشورهای اروپایی مانند کورواسی و سوئیس تیپ ۱ شایع است. درحالی‌که SCCmec تیپ ۴ در کشورهای اسپانیا، پرتغال، آلمان، یونان، ایرلند، دانمارک، فرانسه و فنلاند شایع است. در ایالات متحده امریکا SCCmec تیپ ۲ و ۴ بیش‌تر شایع است. هم‌چنین SCCmec Iva در ۴۳٪ از سویه‌های به‌دست آمده در SCCmec سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد (Peng و همکاران، ۲۰۱۰).

با توجه به مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف مشاهده می‌شود که انتشار تایپ‌های مختلف SCCmec در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار متفاوت است که ممکن است به‌دلیل متفاوت بودن شرایط جغرافیایی مختلف باشد که در انتقال این ژن‌ها که توسط عوامل مختلف از قبیل ترانسپوزون‌ها، پلاسمیدها، فاژها و عوامل دیگری منتقل می‌گردند دخالت داشته باشد علاوه بر آن فرهنگ بهداشتی کشورهای مختلف نیز متفاوت بوده که می‌تواند در انتشار این ژن‌ها و تایپ‌های مختلف دخیل باشد که شامل:

۱- مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در جامعه، ۲- استفاده از آنتی‌بیوتیک نامناسب در درمان، ۳- عدم انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای تعیین دوز درمانی مناسب، ۴- استفاده از آنتی‌بیوتیک در غذای دام و طیور از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد.

در این مطالعه تایپ III با بیش‌ترین فراوانی غالب‌ترین تایپ بوده و تایپ IVd در هیچ‌یک از نمونه‌ها قابل تایپ‌بندی نبوده، فراوانی سویه‌های MRSA در تهران بالاست و پایش مقاومت دارویی و جداسازی MRSA مورد توجه بوده که تایپ II عمدتاً سبب مقاومت به متی‌سیلین و سایر بتالاکتام‌ها می‌شود و تایپ III غالباً باعث ایجاد مقاومت‌های چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و غیربتالاکتامی می‌گردند که باعث دو چندان شدن مشکلات درمانی به‌خصوص در بخش‌های بیمارستانی می‌شود. از طرفی شیوع واقعی سویه‌های MRSA وابستگی زیادی به ناحیه جغرافیایی دارد بنابراین عاقلانه است که به‌دلیل تغییر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *استافیلوکوکوس* بررسی‌های دوره‌ای این تغییرات انجام گیرد.

## منابع


۱. **Abdollahi, A.; Koohpayeh, S.; Najafipoor, S.; Mansoori, Y.; Abdollahi, S. and Jaafari, S., 2012.** Evaluation of drug Resistance and Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) types among methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus (MRSA). J Alborz Health. Vol. 1, No. 1, pp: 47-52.

۲. **Adaleti, R.; Nakipoglu, Y.; Karahan, Z.C.; Tasdemir, C. and Kaya, F., 2008.** Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin resistant Staphylococcus aureus. J Infect Dev Ctries. Vol. 2, No. 1, pp: 46-50.

۳. **Amiri, Z.; Safari, D. and Mousavi, Gh., 2010.** SCCmec gene cassette chromosome complex molecular

characterization and typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples martyr Beheshti Hospital during the year. Quarterly Journal of grace. Vol. 4, No. 14, pp: 439-446.

۴. **Boucher, H.; Miller, L.G. and Razonable, R.R., 2010.** Serious Infections Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. Vol. 51, No. S2, pp: 183-197.

۵. **Casey, A.L.; Lambert, P.A. and Elliott, T., 2007.** Staphylococci. Int J Antimicrob Agents. Vol. 29, No. 3, pp: S23-S32.

۶. **Chung, T.P.: Ito, T. and Ma, X.X., 2006.** Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. Antimicrob. Agents. Chemother. Vol. 50, pp: 1001-1012.

۷. **Da silva, E.R.; Boechat, J.U.D. and Da Silva, N.,** 2006. Coagulase polymorphism of Staphylococcus aureus isolated from goat mastitis in Brazilian dairy herds. Latters in Appleid Microbiology. Vol. 42, pp: 30-34.

۸. **Fatholahzadeh, B.; Emaneini, M.; Gilbert, G.; Udo, E.; Aligholi, M.; Modarressi, M.H.; Nouri, K.; Sedaghat, H. and Feizabadi, M.M., 2008.** Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microb Drug Resist. Vol. 14, No. 3, pp: 217-220.

۹. **Ghaznavi-Rad, E.; Nor Shamsudin, M.; Sekawi, Z.; van Belkum, A. and Neela, V., 2010.** A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome mec types in meticillinresistant Staphylococcus aureus. Journal of Medical Microbiology. Vol. 59, pp: 1135-1139.

۱۰. **Hwwari, A.; Hendrix, E.; Hebden, J.; Edelman, R.; Martin, M. and Campbell, W., 1998.** Phenoytpic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. J Clin Microbiol. Vol. 36, pp: 414-420.

۱۱. **Ishino, K.; Tsuchizaki, N.; Isheikawa, J. and Hotta, K., 2007.** Usefulness of PCR-RFLP typing of the coagulase gene to discriminate Arbekacin resistant methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 45, No. 2, pp: 607-609.

۱۲. **Ito, T.; Okuma, K.; Ma, X.X.; Yuzawa, H. and Hiramatsu, K., 2003.** Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC.Drug Resist Updat. Vol. 6, No. 1, pp: 41-52.

۱۳. **Ito, T.; Katayama, Y. and Asanda, K., 2001**. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Ch. Vol. 45, No. 12, pp: 1323-1326.

۱۴. **Japoni, A.; Alborzi, A.; Orafa, F.; Rasoli, M. and Farshad, S., 2004.** Distribution patterns of methicillin resistance genes (mecA) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. Iran Biomed J. Vol. 8, pp: 173-178.

۱۵. **Mahon, C.R.; Lehman, D.C. and Manuselis, G., 2007.** *Staphylococcus saprophyticus* identification. Diognostic microbiology.3 th ed, st Louis, MO: Sauders Elsevier. pp: 369-380.

۱۶. **Momtaz, H.; Tajbakhsh, E. and Rahimi, E., 2011.** Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and sub clinical bovine mastitis in Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces of Iran. Comp Clin Pathol. pp: 20-29.

۱۷. **Moon, J.S.; lee, A.R.; Kang, H.M.; Lee, E.S.: Kim, M.N.; PALK, Y.H. and Joo, Y.S., 2007.** Phenotipic and genetypic antibiogram of methicillin resistant *staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in korea. J paing Sci. Vol. 90, pp: 1176-1185.

۱۸. **Nasonova, E.S., 2008.** Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and applications. Tsitologiia. Vol. 50, No. 11, pp: 927-935.

۱۹. **Noto, M.J. and Archer, G.L., 2006.** A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type IV is deficient in CcrAB-mediated SCC*mec* excision. Antimicrob Agents Chemother. Vol. 50, pp: 2782-2788.

۲۰. **Novick, R.P.; Schlievert, P. and Ruzin, A., 2001.** Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infec. Vol. 3, No. 7, pp: 585-594.

۲۱. **Peng, Q.; Hou, B.; Zhou, S.; Huang, Y. and Hua, D., 2010.** Staphylococcal Cassette choromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in a teaching hospital, Shantou, China. African J Microbiol Research. Vol. 4, No. 9, 848 p.

۲۲. **Rahbar, M.; Yaghoobi, M. and Fattahi, A., 2006.** Comparison of Different Laboratory Methods for Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Pak J Med Sci. Vol. 22, No. 4, pp: 442-445.

۲۳. **Reza Zadeh, M.; Ghaznavi Rad, E.; Yousefi, D. and Sarmadian, D., 2014.** Comparison of the two disk diffusion method and polymerase chain reaction (PCR) to detect methicillin-resistant S. aureus strains. In South Medical journal. Vol. 3, No. 17, pp: 280-289.

۲۴. **Takano, T.; Higuchi. W.; Otsuka, T.; Baranovich, T.; Enany, S. and Saito, K., 2008.** Novel characteristics of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. Vol. 52, No. 3, pp: 837-845.

۲۵. **Tenover, F.C. and Moellering, R.C., 2007.** The Rationale for Revising the Clinical and Laboratory Standards Institute Vancomycin Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Criteria for Staphylococcus aureus. Clin Infec Dis. Vol. 44, No. 9, pp: 1208-1215.

۲۶. **Thong, K.l.; Jumie, j.; liew, F.Y.; Yusof, M.Y. and Hanifah, Y.A., 2009.** Antibiograms and molecular subtypes of methicillin resistant staphylococcus aureus in local teching hospital, Malaysia. J Microbiol Biotechnol. Vol. 19, pp: 1265-1270.

۲۷. **Warsa, U.C.; Okubo, T. and Okamoto, R., 1996.** Antimicrobial susceptibilities and phage typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Indonesia. Journal of Infection and Chemotherapy. Vol. 2, No. 1, pp: 29-33.