



Research Article

Molecular Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec (*SCCmec*) in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples

Parastoo Zarghami Moghaddam ¹ , Amir Azimian ^{2,*} , Abbas Akhavan Sepahi ³ , Alireza Iranbakhsh ⁴

¹ Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

³ Department of Microbiology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* **Corresponding author:** Amir Azimian, Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: amir_azimian2003@yahoo.com

DOI: [10.52547/nkums.13.2.90](https://doi.org/10.52547/nkums.13.2.90)

How to Cite this Article:

Zarghami Moghaddam P, Azimian A, Akhavan Sepahi A, Iranbakhsh A. Molecular Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec (*SCCmec*) in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples. *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2021;**13**(2):90-97. DOI: [10.29252/nkjms-130212](https://doi.org/10.29252/nkjms-130212)

Received: 03 Jan 2021

Accepted: 14 Apr 2021

Keywords:

Polymerase Chain Reaction,
Staphylococcus aureus,
Staphylococcal Cassette
Chromosome Mec

Abstract

Introduction: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has been considered as one of the pathogens involved in nosocomial infections. The study of drug resistance and typing of this bacterium is an effective measure to prevent and spread it. This study aimed to detect the *mecA* gene as well as *SCCmec* typing of *Staphylococcus aureus* isolates isolated from clinical specimens.

Methods: After collection, 308 clinical specimens were identified as *Staphylococcus aureus* isolates by confirmatory tests. Drug susceptibility was assessed by agar screen method and after DNA extraction by PCR, strains with *mecA* gene were identified and *SCCmec* typing was performed by multiplex PCR.

Results: *Staphylococcus aureus* isolates showed resistance to methicillin in the agar screen method, but in the PCR method, 73% of them showed *mecA* positive gene. The results showed that these six strains were resistant to methicillin in the agar screen test but did not have the *mecA* gene in the PCR method. The highest percentage of samples belonged to *SCCmec* IV type (37%) and then belonged to *SCCmecIII* (31%).

Conclusions: More than 73% of *Staphylococcus aureus* strains had the *mecA* gene and 56% of them were registered as hospital-acquired strains.



تیپ بندی مولکولی کاست کروموزومی ژن mec در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس

مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه‌های بالینی

پرستو ضرغامی مقدم^۱ ID، امیر عظیمیان^{۲*} ID، عباس اخوان سپهری^۳ ID، علیرضا ایرانبخش^۴ ID

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲ گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

^۳ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

^۴ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: امیر عظیمیان، گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: amir_azimian2003@yahoo.com

DOI: 10.52547/nkums.13.2.90

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۴	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵	مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای دخیل در عفونت‌های بیمارستانی بسیار مورد توجه قرار گرفته که مطالعه بر روی مقاومت دارویی و تیپ بندی این باکتری، اقدامی کارا در جهت پیشگیری و گسترش آن محسوب می‌گردد. هدف از این مطالعه تشخیص ژن <i>mecA</i> و همچنین تیپ بندی <i>SCCmec</i> ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی می‌باشد.
واژگان کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، استافیلوکوکوس اورئوس، Staphylococcal Cassette Chromosome Mec	روش کار: ۳۰۸ نمونه بالینی پس از جمع آوری، توسط تست‌های تاییدی به عنوان ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس شناخته شدند. بررسی حساسیت دارویی توسط روش آگار اسکرین انجام شد و بعد از استخراج DNA با روش PCR سویه‌های دارای ژن <i>mecA</i> شناسایی و تیپ بندی <i>SCCmec</i> توسط Multiplex PCR صورت گرفت.
	یافته‌ها: ۷۵٪ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس در روش آگار اسکرین مقاومت به متی سیلین نشان دادند ولی در روش PCR ۷۳٪ از آنها ژن <i>mecA</i> مثبت مشاهده شد. بررسی نتایج نشان داد که این شش سویه در تست آگار اسکرین نسبت به متی سیلین مقاوم بوده ولی در روش PCR فاقد ژن <i>mecA</i> بودند. بیشترین درصد نمونه‌ها متعلق به تیپ (۳۷٪) <i>SCCmec IV</i> و سپس متعلق به (۳۱٪) <i>SCCmec III</i> بود.
	نتیجه گیری: بیش از ۷۳٪ از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن <i>mecA</i> بوده و ۵۶٪ آن‌ها از نوع سویه‌های اکتسابی از بیمارستان ثبت شدند.

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت، بخشی از فلور طبیعی انسان می‌باشد که در طول سال‌های گذشته به یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های فرصت طلب انسانی مبدل گردیده است. این باکتری به همراه سودوموناس آئروجینوزا، اشرشیاکلی و اسینتوباکتر از عوامل اصلی عفونت‌های باکتریایی بیمارستانی شناخته شده است (۱) که قادر به ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها از یک عفونت پوستی ساده تا پنومونی نکروزه کننده کشنده، سندرم فلسی شدن پوست و سندرم شوک سمی، استئومیلیت، مسمویت‌های غذایی و عفونت‌های ادراری می‌باشد (۲). این باکتری دارای ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس متعدد است که بر روی کروموزوم و عناصر متحرک قرار گرفته‌اند. از مهمترین علل موفقیت این باکتری در ایجاد بیماری، تنوع بروز آن در شرایط گوناگون همراه با الگوهای مختلف مقاومت آنتی بیوتیکی، توانایی بالا در تبادلات ژنتیکی، پلاسمیدهای حاوی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی و قدرت تخریب ذاتیست که به یک بازنگرانی

اصلی سلامت عمومی تبدیل شده است (۳-۵). از مهمترین مشکلات در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی بروز بالای مقاومت آنتی بیوتیکی و پتانسیل بالای کسب ژن‌های خارجی در جهت بروز این مقاومت‌هاست که روند درمان عفونت‌های این باکتری را با مشکل مواجه می‌سازد (۶) که از این بین به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) بیشتر توجه شده است. مقاومت نسبت به متی سیلین ناشی از فعالیت ژن‌های موجود در کروموزوم *mecA* و *mecC* است (۷-۹) که با تولید پروتئین جدیدی به نام PBP2a سبب مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام می‌گردد. در باکتری حساس فاقد ژن *mecA* متی سیلین با میل ترکیبی بیشتری به پروتئین PBP2a در دیواره سلول متصل شده که سبب لیز دیواره سلول باکتری و سرانجام مرگ آن می‌گردد (۱۰، ۱۱). این ژن‌ها بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرک و بزرگ به نام (*SCCmec*) می‌باشند که این عنصر ژنتیکی از مجموعه‌ای از ژن‌های تنظیمی (*mecI*, *mecR*, *mecC*) و کمپلکس

جداسازی سویه‌های MRSA براساس استانداردهای CLSI 2018 انجام شد. ابتدا سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط TSB تهیه سپس روی محیط مولر هینتون آگار حاوی ۴ درصد NaCl و ۶ میکروگرم بریمی لیتر آنتی بیوتیک اگراسیلین (استرالیا Sigm) بصورت نقطه‌ای کشت داده شد و بمدت ۲۴ ساعت در انکوباسیون ۳۵°C قرار گرفت. در صورت رشد، باکتری به عنوان سویه مقاوم به متی سیلین در نظر گرفته شد. پلیت های فاقد کلنی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدداً بررسی شدند (۱۷).

۲. تست‌های ژنوتیپی

۲.۱. استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی /استافیلوکوکوس/ اورئوس های ایزوله شده با استفاده از کیت (QiaAmp DNA Mini Kit) شرکت QIAGEN (براکت آلمان) انجام شد. مقداری از کلنی ایزوله‌ها به محیط کشت LB برات (مرک آلمان) تلقیح و پس از آن سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ انجام گرفت. بر روی رسوب حاصله ۳۰ µg/ml از بافر لیزکننده لیزواستافین اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرما گذاری گردید. سپس پروتئین کیناز K و دیگر محلول‌های ذکر شده در پروتکل الصاقی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد گرما گذاری شد. سپس با افزودن اتانول و سانتریفیوژ آن و اضافه نمودن اتانول ۷۰ درصد و بیرون ریختن مواد رویی DNA استخراج شده رسوب کرد. سپس بافر حل کننده به رسوب DNA اضافه و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۸).

۲.۲. واکنش PCR برای تشخیص ژن *mecA*

انجام آزمایش PCR و تشخیص ژن *mecA* در نمونه‌های MRSA براساس پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ صورت گرفت. مخلوط نهایی واکنش شامل ۰/۸ میکرولیتر از هر جفت پرایمر (pmol) EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (۱۲/۵، ۱۰ میکرولیتر (Takara, Japan)، ۵ میکرولیتر DNA الگو که با آب دیونیزه به حجم رسید. سپس این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر به تعداد ۴۰ سیکل قرار داده شد: مرحله Primary denaturation به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ °C، مرحله Denaturation به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C، مرحله Annealing به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۷ °C، مرحله Extension به مدت ۳۰ ثانیه در ۷۲ °C و مرحله Final Extension به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ °C انجام شد. کنترل مثبت سویه *Staphylococcus aureus* ATCC43300 انتخاب گردید. بررسی محصول PCR از روش الکتروفورز بوسیله ژل آگارز ۱،۵ درصد با ولتاژ حدود ۱۱۰ ولت به مدت تقریبی یک ساعت استفاده شد که بعد از رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک مشاهده شد (۱۸، ۱۹).

۳.۲. SCCmec typing

SCCmec typing با روش Multiplex PCR بر روی سویه‌های دارای ژن *mecA* انجام گرفت. طی این واکنش از Master mix استفاده شد که حاوی ۲/۵ µl بافر واکنش، ۰/۵ µl از پرایمر F و R و ۱۰-۱۰۰ ng DNA الگو بود. Multiplex PCR با استفاده از پرایمر های جدول ۲ و دستگاه ترموسایکلر به تعداد ۳۰ سیکل انجام شد: مرحله Primary

(*ccrA*) و نوع کلاس *mec complex* از هم متمایز می‌گردند. تاکنون ۱۳ تایپ مختلف از SCCmec با اندازه‌های متفاوت شناخته شده، تیپ‌های VII و VI، IV، I، عمدتاً سبب مقاومت به متی سیلین و سایر بتالاکتام ها می‌شوند، تیپ‌های III و II غالباً باعث ایجاد مقاومت‌های چندگانه نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی و غیربتالاکتامی شده و ژن مقاومت به (توبرامایسین، کانامایسین، کاربولید، لینکوزامید-استرپتوگرامین) را حمل می‌نمایند و سایر تیپ‌ها نیز در ایجاد مقاومت ضد میکروبی در بخش‌های مختلف از جمله بیمارستان‌ها، جامعه و دامپروری نقش دارند. نوع XI نیز در انسان‌ها نادر گزارش شده است (۱۲-۱۴). این باکتری یک عامل مهم در ایجاد عفونت‌های اکتسابی از جامعه (CA-MRSA) و بیمارستان (HA-MRSA) می‌باشد. سویه‌های CA-MRSA درمقایسه با سویه‌های HA-MRSA به علت ایجاد توکسین لکوسیدین پنتن والنتین بیماری‌زایی بیشتری داشته و قابلیت بیشتری در بروز بیماری‌های جدی و شدید دارند. مطالعات اخیر گزارش کرده‌اند که سویه‌های CA-MRSA در محیط بیمارستان در حال گسترش هستند و جایگزین سویه‌های HA-MRSA می‌شوند (۱۲، ۱۵، ۱۶). با توجه به اهمیت سویه‌های /استافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین در بیمارستان و جامعه و عدم آگاهی کافی نسبت به شیوع آن، این تحقیق به منظور بررسی ایزوله‌های /استافیلوکوکوس/ اورئوس واجد ژن *mecA* و همچنین تیپ بندی SCCmec با استفاده از تکنیک Multiplex PCR انجام شد.

روش کار

نمونه گیری

این مطالعه از نوع مقطعی/توصیفی و از نوع Cross sectional می‌باشد که نمونه گیری غیر تصادفی ساده بعد از ارائه توضیحات لازم به افراد انجام گردید که نمونه‌های بالینی شامل (زخم، آبسه، خلط، خون، ادرار، مایع نخاع و مایع مفصل، بافت، کاتتر، پریوتن، برونش، بینی، تراشه، گلو، چشم، مایع سینوویال) بیماران سرپایی و بستری در بخش‌های (اطفال، داخلی، جراحی، اورژانس، اورولوژی، روماتولوژی، نوزادان، نورولوژی، اورتوپدی، عفونی، سوختگی، ICU...) ارسال شده به آزمایشگاه بیمارستان امام رضا (ع) شهرستان بجنورد در طی بازه زمانی پنجساله (۱۳۹۷-۱۳۹۲) صورت گرفت.

۱. تست‌های فنوتیپی

۱.۱. تست‌های تاییدی

تأیید ایزوله‌های /استافیلوکوکوس/ اورئوس با استفاده از روشهای فنوتیپی استاندارد آزمایشگاهی (رنگ آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، کوآگولاز، کشت در محیط مانیتول سالت آگار، DNase) شناسایی و جداسازی گردیدند. ایزوله‌های تأیید شده برای انجام مراحل بعدی در محیط Skim milk برات نگهداری شدند (۱۷).

۱.۲. تعیین مقاومت نسبت به متی سیلین به روش غربالگری اگراسیلین

aureus و *Enterococcus faecalis* ATCC52199
ATCC43300 *Staphylococcus*
محصول PCR از روش الکتروفورز بوسیله ژل آگارز ۱.۵ درصد با ولتاژ
حدود ۱۱۰ ولت به مدت تقریبی یک ساعت استفاده شد و بعد از رنگ
آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک مشاهده شد (۲۰).

denaturation به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴°C، مرحله
Denaturation به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، مرحله
Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵°C، مرحله
Extension به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و مرحله
Final Extension به مدت ۴ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. کنترل مثبت سویه

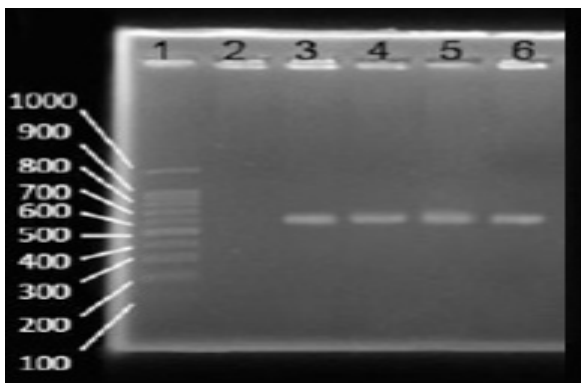
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای PCR

اندازه	پرایمر	ژن
۵۸۳bp	<i>mecA</i> 5'-AGAAGATGGTATGTGGAAGTTAG-3'	<i>mecA</i>
	<i>mecAR</i> 5'-ATGTATGTGCGATTGTATTGC-3'	

جدول ۲. پرایمرهای مورد نیاز در روش SCCmec تایپینگ

اندازه	مشخصات	نام پرایمر
۹۳۷bp	5'-ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT-3'	F β
	5'-TAAAGGCATCAATGCACAAACACT-3'	R α3
۵۱۸bp	5'-CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT-3'	F ccrC
	5'-CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT-3'	R ccrC
۴۱۵bp	5'-GCCACTCATAACATATGGAA-3'	F 1272
	5'-CATCCGAGTGAAACCCAAA-3'	R 1272
۳۵۹bp	5'-TATACCAAACCCGACAACACTAC-3'	F 5RmecA
	5'-CGGCTACAGTGATAACATCC-3'	R 5R431
۳۲۵bp	5'-GAACATTGTTACTTAAATGAGCG-3'	F 5c2
	5'-TGAAAGTTGTACCCCTTGACACC-3'	R 5c2

آنالیز آماری (۷۳٪) ۲۲۵ ایزوله دارای ژن *mecA* و (۲۷٪) ۸۳ ایزوله نیز فاقد این ژن بودند (شکل ۱).



شکل ۱. محصول PCR ژن *mecA* در چاهک ۱ مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۲ نمونه کنترل منفی، چاهک ۳ نمونه کنترل مثبت، چاهک ۴ و ۵، ۶ نمونه بالینی دارای ژن *mecA*

مقایسه نتایج روش فنوتیپی (آگار اسکرین) و روش ژنوتیپی (PCR) ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این بررسی از مجموع ۳۰۸ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس*، (۷۵٪) ۲۳۱ ایزوله با روش فنوتیپی آگار اسکرین مقاوم به متی سیلین بودند همچنین (۷۳٪) ۲۲۵ از ۳۰۸ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شده با PCR دارای ژن *mecA* بودند. بررسی نتایج نشان داد که این شش سویه در تست آگار اسکرین نسبت به متی سیلین مقاوم بوده ولی در روش PCR فاقد ژن *mecA* بودند. در آنالیز آماری اختلاف معناداری بین دو روش به کار برده شده جهت مشخص کردن سویه‌های حساس و مقاوم وجود نداشت ($P > 0.05$).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 18 و آزمون آماری کای دو انجام گردید. مرز معناداری بر روی $p < 0.05$ قرار داده شد.

فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در مجموع ۳۰۸ نمونه مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی (زخم، آبسه، خلط، خون، ادرار، مایع نخاع و مایع مفصل، بافت، کاتتر، پری‌توتن، برونش، بینی، تراشه، گلو، چشم، مایع سینوویال) از بیماران (بستری - سرپایی) بیمارستان امام رضا (ع) بجنورد در طی بازه زمانی ۱۳۹۷-۱۳۹۲ جدا گردید که بخش داخلی بیمارستان بالاترین نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* (۳۱٪) را به خود اختصاص داد، همچنین بیشترین و کمترین درصد نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز به ترتیب مربوط به نمونه‌های زخم (۲۷٪)، کاتتر و سینوویال (۱،۲۹٪) بودند.

نتایج تعیین مقاومت نسبت به متی سیلین با روش آگار اسکرین

در این روش از محیط کشت MHA حاوی پودر اگزاسیلین جهت شناسایی سویه‌های مقاوم به متی سیلین استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که (۷۵٪) ۲۳۱ ایزوله‌ها مقاوم به اگزاسیلین بوده که قادر به رشد در محیط کشت حاوی اگزاسیلین بودند و (۲۵٪) ۷۷ ایزوله نیز حساس مشاهده شد.

نتایج واکنش PCR بررسی ژن مقاومت *mecA*

بر روی تمامی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده، PCR جهت تشخیص ژن *mecA* انجام گردید. از ۳۰۸ ایزوله مورد بررسی،

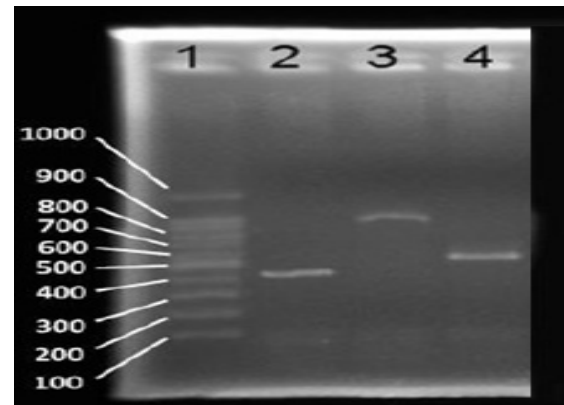
در مطالعه محسنی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در بیمارستان‌های آموزشی مازندران حدود ۶۶ درصد جدایه‌ها مقاوم به متی‌سیلین بودند، همچنین نتایج سنجش غربالگری باکتری‌ها به روش اگزاسیلین آگار نشان داد که ۷۱ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و ۸۱ درصد از باکتری‌ها واجد ژن مقاومت به متی‌سیلین *mecA* بودند. از میان پنج جدایه مقاوم به متی‌سیلین (به روش اگزاسیلین آگار)، تعداد دو جدایه واجد ژن *mecA* بودند. میان روش‌های فنوتیپی استفاده شده در سنجش حساسیت به متی‌سیلین تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین تفاوت روش غربالگری اگزاسیلین آگار با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *mecA* از نظر آماری معنی‌دار نبود (۲۳). در بررسی ما ۲۳۱ ایزوله در روش فنوتیپی آگار اسکرین مقاومت نشان دادند ولی در روش PCR تعداد ۲۲۵ ایزوله ژن *mecA* مثبت مشاهده شد. این شش سویه در تست آگار اسکرین نسبت به متی‌سیلین مقاوم ولی در روش PCR فاقد ژن *mecA* بودند. مطالعات ژنوتیپی مختلف نشان داده که به دلیل بیان غیر یکنواخت ژن *mecA*، تست‌های تشخیصی برای نشان دادن سویه‌های MRSA نتایج متفاوتی را نشان می‌دهند (۲۴). مطالعات قبلی نشان داده است که میزان MRSA در ایران از ۱۹٪ تا ۹۰٪ در شهرهای مختلف متفاوت است و در تهران ۳۰٪ گزارش گردید که تنوع مشاهده شده در گزارش‌های مختلف را می‌توان تا حدی به دلیل موقعیت‌های جغرافیایی متفاوت، روش‌ها و تکنیک‌های مورد استفاده، جمعیت‌های مختلف، کیفیت نمونه‌گیری بیمارستانی و تجویز آنتی‌بیوتیک و اقدامات بهداشتی در بیمارستان دانست (۲۵-۲۷).

در مطالعه رحیمی و همکارانش در شهر اصفهان بر روی ۲۹۳ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از یک بیمارستان نشان داد در میان جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۰۱ سویه به عنوان سویه‌های MRSA انتخاب شدند و هیچکدام از سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، لینزولید مقاومت نشان ندادند، تمامی سویه‌ها واجد ژن *mecA* و *SCCmec* تایپ III بودند، لذا پراکندگی بالای سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین واجد *SCCmec* تایپ III که شاخص سویه‌های بیمارستانی است نشان دهنده شیوع بالای جدایه‌های بسیار بیمارزای واجد مقاومت چندگانه نسبت به بسیاری از داروهای معمول خطوط اول و دوم درمانی است که می‌تواند یک تهدید بالقوه برای سلامت عمومی و بهداشت جامعه باشد (۲۸). در تحقیق ما همه پنج تیپ *SCCmec* (I-V) شناسایی شدند که حاکی از تنوع وسیع در بیمارستان مورد مطالعه می‌باشد که *SCCmec* III به عنوان دومین تایپ سویه‌های مورد بررسی با ۳۱٪ شناسایی گردید و بیشترین درصد مربوط به *SCCmec* IV (۲۷٪) بود.

مطالعات دیگر توسط Fatholahzadeh و همکاران در شهر تهران در سال ۲۰۰۹ نشان داد، ۹۴٪ از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین واجد *SCCmec* تایپ III و ۶٪ نیز واجد *SCCmec* تایپ IV بودند (۲۹). بالعکس در مطالعه ما بیشترین تایپ مربوط به *SCCmec* IV (۳۷٪) و سپس *SCCmec* III ۳۱٪ ثبت

واکنش PCR برای تعیین تیپ‌های *SCCmec*

واکنش Multiplex PCR جهت تعیین تیپ‌های *SCCmec* برای سویه‌های *mecA* مثبت انجام گردید، که در مطالعه حاضر همه پنج تیپ *SCCmec* (I-V) شناسایی شدند که فراوانی آنها (۱۴٪) *SCCmec* I (۱۱٪)، *SCCmec* II (۳۱٪)، *SCCmec* III (۳۷٪)، *SCCmec* IV (۶٪) و *SCCmec* V ثبت گردید. بیشترین درصد نمونه‌ها متعلق به تیپ *SCCmec* IV (۳۷٪) و سپس متعلق به *SCCmec* III (۳۱٪) بود. آنالیز آماری اختلاف معناداری را در بین پنج گروه نشان داد $p < 0.05$ با *SCCmec* IV. در بخش داخلی بیمارستان (۳۰٪) در جنس مذکر (۶۳٪) و در ضایعه زخم (۵۴٪) و نمونه خون (۵۱٪) مشاهده گردید. *SCCmec* III نیز بیشتر در نمونه خون (۲۴٪)، بخش داخلی بیمارستان (۲۸٪) و در جنس مذکر (۶۱٪) ثبت شد (شکل ۲). بر اساس اطلاعات بدست آمده از *SCCmec* تایپینگ، میزان فراوانی سویه‌های اکتسابی از بیمارستان (HA-MRSA) ۵۶٪ و سویه‌های اکتسابی از جامعه (CA-MRSA) ۴۳٪ محاسبه گردید.



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR برای تعیین تیپ *SCCmec* در ایزوله‌های بالینی. چاهک ۱ مارکر ۱۰۰۰bp، چاهک‌های ۲ تا ۴ حاوی محصول PCR ایزوله‌های *SCCmec* تیپ‌های مختلف می‌باشند.

بحث

در بررسی‌های فنوتیپی ما بر روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، تعداد ۷۵٪ ایزوله‌ها در روش آگار اسکرین به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین مقاومت نشان دادند. در مطالعه ژنوتیپی نیز ۷۳٪ ایزوله واجد ژن مقاومت به متی‌سیلین *mecA* بودند. *SCCmec* IV به عنوان تیپ شاخص بیشتر در نمونه خون، بخش داخلی بیمارستان و در جنس مذکر ثبت شد و میزان فراوانی سویه‌های اکتسابی از بیمارستان (HA-MRSA) ۵۶٪ محاسبه گردید.

امروزه توجه به گسترش روز افزون سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و توانایی‌های منحصر به فرد این باکتری در انتقال فاکتورهای مقاومت و تشخیص گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های جدید، مطالعات مختلف جهت یافتن راهکارهایی به منظور کنترل و حذف این سویه‌ها در جامعه ضروری می‌باشد (۲۱، ۲۲).

در مطالعه Thong و همکارانش که در کره جنوبی بر روی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین صورت گرفت، فراوانی *SCCmec* تایپ های II و III و IV به ترتیب ۳۰، ۲۵ و ۴۳ درصد بود (۳۵).

در کشور اسلونی از مجموعه ۳۱ سویه MRSA، ۱۶ سویه *SCCmec* تایپ IV، ۷ سویه تیپ I، ۲ سویه تیپ III و ۶ سویه غیرقابل تیپ بندی بودند. در کشور مالزی از ۶۶ سویه MRSA تنها دو تیپ مشاهده شد و ۵۲ سویه *SCCmec* تیپ III و ۱۴ سویه تیپ II بودند (۳۶). قاسمیان نیز در مطالعه خود *SCCmec* III را در ۶۰٪ و تیپ IV را ۲۱٪ در ایران شناسایی کرد (۳۷).

مطالعه Rahimi و همکارانش بر روی ۱۲۷ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در تهران انجام شد که نتایج آنها نشان داد که تمامی سویه ها واجد ژن *mecA* بودند. نتایج حاصل از *SCCmec* تایپینگ سویه ها بیان کرد که ۸۱٪ سویه ها واجد *SCCmec* تایپ III بودند، همچنین ۱۱ سویه (۹٪) نیز دارای *IVa SCCmec* بود (۲۶). مطالعات دیگر نیز در نقاط مختلف ایران نشان داد که IV و III جز *SCCmec* های غالب MRSA بالینی کشور می باشند (۲۵، ۳۸). در مطالعه ما نیز در شمال شرق ایران بالاترین درصد مربوط به *SCCmec* نوع IV و III بود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه میزان بالایی از مقاومت به متی سیلین را در میان ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شهرستان بجنورد را نشان داد که به عنوان تهدید جدی در بحث بهداشت و درمان محسوب می شود که می تواند با تغییر در مصرف آنتی بیوتیک ها و اعمال استراتژی کنترل عفونت در سویه های MRSA قابل کنترل باشد. تنوع تیپ های کاست کروموزومی ژن *mec* نیز در روش *SCCmec* تایپینگ قابل مشاهده است که این روش می تواند به عنوان ابزاری مناسب در کنار سایر روش های مولکولی در تیپ بندی و شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مورد استفاده قرار گیرد. لذا مطالعه دوره ای فنوتیپی و ژنوتیپی وسیع تر بر روی سویه های MRSA بیمارستانی برای یافتن درمان های کارآمد و مؤثر ضروری به نظر می رسد.

محدودیت ها و مشکلات

مشکلات موجود شامل هزینه های بالای مواد آزمایشگاهی و تکنیک های مولکولی جهت تعیین تیپ سویه های مورد مطالعه می باشند.

تشکر و قدردانی

در پایان از پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان امام رضا (ع) بجنورد که ما را در انجام این مطالعه یاری فرمودند، تشکر و قدردانی می نماییم.

گردید که تفاوت در بازه زمانی، تعداد نمونه های مورد بررسی و مکان می تواند از جمله علل این اختلاف باشد.

مطالعه توصیفی زینلی و همکارانش روی ۱۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان شهید بهشتی کاشان نشان داد بیش از نیمی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* (۸۷ مورد) دارای ژن *mecA* بوده و همچنین *SCCmec* type II فراوان ترین ژنوتیپ جد شده از نمونه ها بود. ۶۰ درصد آنها نیز از جامعه (CA-MRSA) جدا شده بودند (۳۰). مقایسه این دو مطالعه نشان می دهد که تعداد نمونه های مورد مطالعه ما تقریباً دو برابر مطالعه زینلی و همکارانش بوده که در روش PCR تعداد ۲۲۵ ایزوله ژن *mecA* مثبت مشاهده شدند و بیشترین تیپ مربوط به *SCCmec* IV (۳۷٪) بوده و سویه های غالب یافت شده از نوع HA-MRSA بودند.

اوحیدیان و همکاران در مطالعه ای در تهران به بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی و تایپینگ مولکولی سویه های MRSA جدا شده از پرسنل بیمارستانی در تهران پرداختند. *SCCmec* type شایع نیز *SCCmec* IV بود که غالباً متعلق به سویه های اکتسابی از جامعه بود. نهایتاً یافته های کلی نشانگر این بود که سویه های غالب یافت شده از نوع CA-MRSA بودند (۳۱).

در بررسی عبداللهی و همکاران که به مدت یک سال از اردیبهشت سال ۱۳۸۸ تا اردیبهشت سال ۱۳۸۹ در بیمارستان ها و درمانگاه های شهرستان فسا انجام شد از میان ۱۶۴ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۷۸ مورد مقاوم به متی سیلین بودند. هیچ مورد مقاومتی به ونکوماکسین شناسایی نشد، در حالی که مقاومت به تمامی سایر آنتی بیوتیک ها وجود داشت. بیشترین ژنوتیپ میان سویه ها از تیپ *SCCmec* II و کمترین نیز از *SCCmec* IV تایپ شناسایی گردید (۳۲).

در مطالعه دیگری که گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند، بیشترین تیپ MRSA در بخش مراقبتهای ویژه بیمارستان های دانشگاه شهید بهشتی تهران *SCCmec* IV بوده است. میزان شیوع کلی MRSA در این مطالعه ۹۳٪ بود (۳۳). این مطالعه با تحقیق ما در شناسایی تیپ شاخص *SCCmec* IV، مشابهت داشت، *SCCmec* IV اکتسابی از جامعه است که احتمال دارد این تیپ با شیوع بالا، از جامعه در حال ورود به بیمارستان ها باشد. این تیپ عمدتاً سبب مقاومت به متی سیلین و سایر بتالاکتام ها می گردد و حاوی ژن های اضافی برای مقاومت به آنتی بیوتیک غیربتالاکتام نیست.

مطالعه دیگر توسط Chongtrakool و همکاران در سال ۲۰۰۶ که بر روی ۶۱۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از ۱۱ کشور آسیایی نشان داد، ۶۰ درصد جدایه ها واجد *SCCmec* تایپ III و ۳۴ درصد نیز واجد *SCCmec* تایپ II بودند و سویه های غالب یافت شده از نوع HA-MRSA بودند (۳۴). در بررسی ما میزان فراوانی سویه های اکتسابی از بیمارستان (HA-MRSA) ۵۷٪ و سویه های اکتسابی از جامعه (CA-MRSA) ۴۲٪ محاسبه گردید که در مجموع سویه های غالب اکثراً از نوع HA-MRSA بودند.

References



1. Kuehnert MJ, Hill HA, Kupronis BA, Tokars JI, Solomon SL, Jernigan DB. Methicillin-resistant-Staphylococcus aureus hospitalizations, United States. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(6):868-872. doi: 10.3201/eid1106.040831 pmid: 15963281
2. Sadari H, Oliya P, Zafarghandi N, Jalali Nadoushan M. Survey antibiotic resistance pattern in Staphylococcus aureus isolated from Shahed University hospital's personnel nose. (Persian). *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2004;14(42):69-75.
3. Shokouhi Sh, Aminzadeh Z, Sharafi K, Sharafi M. Study antibiotic resistance patterns of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) acquired from hospital. (Persian). *Iran J Microbiol.* 2008;2:59.
4. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med.* 1998;339(8):520-532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806 pmid: 9709046
5. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resistance Updates.* 2003;6(1):41-52. doi: 10.1016/s1368-7646(03)00003-7
6. 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 Journal of Microbiology.* 2012;6(1):80-85. doi: 10.5812/jjm.4616
7. Cesur S, Cokca F. Nasal carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among hospital staff and outpatients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25(2):169-171. doi: 10.1086/502371 pmid: 14994946
8. Khoddami E, Jamshidi AA. Oxacilin resistant staphylococcus aureus isolated from patients and personel in Babol hospital. *JBUMS.* 2001;4(12):43-46.
9. Song JH, Hiramatsu K, Suh JY, Ko KS, Ito T, Kapi M, et al. Emergence in Asian countries of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(12):4926-4928. doi: 10.1128/AAC.48.12.4926-4928.2004 pmid: 15561884
10. Batista de G. Staphylococcus Aureus and Vancomycin Resistance: What Does it Matter? *SciFed Dental & Oral Research Journal.* 2017;1(1):1-5. doi: 10.23959/sfdorj-001
11. Ragbetli C, Parlak M, Bayram Y, Guducuoglu H, Ceylan N. Evaluation of Antimicrobial Resistance in Staphylococcus aureus Isolates by Years. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2016;2016:9171395. doi: 10.1155/2016/9171395 pmid: 27247572
12. Silva EC, Antas M, Monteiro BNA, Rabelo MA, Melo FL, Maciel MA. Prevalence and risk factors for Staphylococcus aureus in health care workers at a university hospital of Recife-PE. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(6):504-508. doi: 10.1590/s1413-86702008000600012 pmid: 19287839
13. Baig S, Johannesen TB, Overballe-Petersen S, Larsen J, Larsen AR, Stegger M. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Infect Genet Evol.* 2018;61:74-76. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.013 pmid: 29567305
14. Takano T, Higuchi W, Zaraket H, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, et al. 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. doi: 10.1128/AAC.01001-07 pmid: 18086843
15. Ohadian-Moghadam S, Havaei S, Pourmand M. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying panton-valentine leukocidin gene in cutaneous infections in the city of Isfahan. *J Med Bacteriol.* 2015;1(1-2):9-16.
16. Mohammadi S, Sekawi Z, Monjezi A, Maleki MH, Soroush S, Sadeghifard N, et al. Emergence of SCCmec type III with variable antimicrobial resistance profiles and spa types among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from healthcare- and community-acquired infections in the west of Iran. *Int J Infect Dis.* 2014;25:152-158. doi: 10.1016/j.ijid.2014.02.018 pmid: 24909489
17. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. *CLSI, Wayne, Pa.* 2014;53(3):1-23.
18. Havaei SA, Azimian A, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Isolation of Asian endemic and livestock associated clones of methicillin resistant Staphylococcus aureus from ocular samples in Northeastern Iran. *Iran J Microbiol.* 2013;5(3):227-232. pmid: 24475328
19. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5857-5860. doi: 10.1128/JCM.42.12.5857-5860.2004 pmid: 15583325
20. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3581-3585. doi: 10.1128/JCM.01727-12 pmid: 22933598
21. Kaczmarek A, Budzynska A, Mikolajczyk D, Gospodarek E. [Comparison of disk-diffusion method and PCR for detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus strains]. *Med Dosw Mikrobiol.* 2006;58(2):87-93. pmid: 17133901
22. Ercis S, Sancak B, Hascelik G. A comparison of PCR detection of mecA with oxacillin disk susceptibility testing in different media and sceptor automated system for both Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolates. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26(1):21-24. doi: 10.4103/0255-0857.38852 pmid: 18227592
23. Mohseni M, Noorpour N. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using phenotypic and genotypic methods in clinical specimens collected from Mazandaran teaching hospitals 2015-2016. (Persian). *J Infectious Diseases Tropic Med Iran.* 2016;73(45):54
24. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2766-2771. doi: 10.1128/JCM.40.8.2766-2771.2002 pmid: 12149327
25. Rahimi F. Characterization of Resistance to Aminoglycosides in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated From a Tertiary Care Hospital in Tehran, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2016;9(1):e29237. doi: 10.5812/jjm.29237 pmid: 27099687
26. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital- and community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Tehran, Iran. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 6):796-804. doi: 10.1099/jmm.0.070722-0 pmid: 24648470
27. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic Resistance Pattern of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus Isolates in Tehran, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2013;6(2):144-149. doi: 10.5812/jjm.4896
28. Rahimi F, Karimi SH, Pourshafie MR. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from patients in Isfahan. (Persian). *J Infectious Diseases Tropic Med Iran.* 2014;64:21-30.
29. Fatholahzadeh B, Emameini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist.* 2008;14(3):217-220. doi: 10.1089/mdr.2008.0822 pmid: 18694326
30. Zeinali E, Moniri R, Safari M, Mousavi SGA. Molecular characterization and SCCmec typing in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from clinical samples. (Persian). *Feyz.* 2011;14(4):439-446.
31. Ohadian Moghadam S, Modoodi Yaghoobi M, Pourramezan N, Pourmand MR. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of the CA-MRSA isolated from healthcare workers,

- Tehran, Iran. *Microb Pathog.* 2017;**107**:409-412. doi: [10.1016/j.micpath.2017.04.027](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.027) pmid: 28435108
32. Abdollahi A, Koohpayeh SA, Najafipour S, Mansoori Y, Abdollahi S, Jaafari S. Evaluation of drug Resistance and Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) types among methicillin-Resistant Staphylococcus aureus(MRSA). *Alborz University Medical Journal.* 2012;**1**(1):47-52. doi: [10.18869/acadpub.aums.1.1.47](https://doi.org/10.18869/acadpub.aums.1.1.47)
 33. Goudarzi M, Goudarzi H, Figueiredo AMS, Udo EE, Fazeli M, Asadzadeh M. 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.
 34. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. 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.* 2006;**50**(3):1001-1012. doi: [10.1128/AAC.50.3.1001-1012.2006](https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.1001-1012.2006) pmid: 16495263
 35. Kim ES, Song JS, Lee HJ, Choe PG, Park KH, Cho JH, et al. A survey of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2007;**60**(5):1108-1114. doi: [10.1093/jac/dkm309](https://doi.org/10.1093/jac/dkm309) pmid: 17884831
 36. Thong KL, Junnie J, Liew FY, Yusof MY, Hanifah YA. Antibigrams and molecular subtypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in local teaching hospital, Malaysia. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;**19**(10):1265-1270. pmid: 19884790
 37. Ghasemian A, Mirzaee M. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Strains and the Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types in Iran. *Infect Epidemiol Med.* 2016;**2**(3):31-34.
 38. 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. pmid: 21266752