



دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی

عنوان

تایپینگ مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین
جدا شده از نمونه‌های بستری و سرپایی بیمارستان آموزشی الزهراء اصفهان
با استفاده روش‌های *agr*, *spa*, *dru* در سال ۱۳۹۸

استاد راهنما

دکتر محمد نیاکان

استاد مشاور


خانم دکتر تهmine نریمانی

دانشجو

محمد لطیف پور

تابستان ۱۴۰۱



شماره: (شماره ثبت نوشته شود)	اظهارنامه دانشجو	
تاریخ: (تاریخ دفاع نوشته شود)		

اینجانب **محمد لطیف پور** دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، گواهی می‌دهم که پایان‌نامه تدوین شده حاضر با عنوان: «**تایپینگ مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه های بستری و سرپایی بیمارستان آموزشی الزهرای اصفهان با استفاده روش‌های Agr, Spa, Dru در سال ۱۳۹۸**» به راهنمایی استاد محترم **جناب آقای دکتر محمد نیاکان** و توسط شخص اینجانب انجام و صحت و اصالت مطالب تدوین شده در آن، مورد تایید است و چنانچه هر زمان دانشگاه کسب اطلاع کند که گزارش پایان‌نامه حاضر صحت و اصالت لازم را نداشته، دانشگاه حق دارد مدرک تحصیلی اینجانب را مسترد و ابطال نماید؛ همچنین اعلام می‌دارد در صورت بهره‌گیری از منابع مختلف شامل: گزارش تحقیقاتی، رساله، پایان‌نامه، کتاب، مقالات تخصصی و سایر اطلاعاتی، به منبع مورد استفاده و پدیدآورنده آن به طور دقیق ارجاع داده شده و نیز مطالب مندرج پایان‌نامه حاضر تاکنون برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی توسط اینجانب و یا سایر افراد به هیچ کجا ارائه نشده است. در تدوین متن پایان‌نامه حاضر، چارچوب مصوب تدوین گزارش‌های پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشگاه شاهد به طور کامل مراعات شده و نهایتاً این که، کلیه حقوق مادی ناشی از گزارش پایان‌نامه حاضر، متعلق به دانشگاه شاهد می‌باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو

امضای دانشجو

تاریخ:

توجه:

گواهی جلسه دفاع از دفتر پژوهشی دانشکده (آقای اسفنجانی) دریافت و جایگزین این صفحه

گردد (اصل گواهی در نسخه صحافی و گواهی اسکن شده در فایل نهایی پایان نامه قرار گیرد).

تقدیم به:

کسانی که دوستشان دارید و می‌خواهید به آن‌ها تقدیم نمایید.

قسمت اهداء اثر خود را در این صفحه درج کنید.

سپاسگزاری

سپاسگزاری و تقدیر را در این صفحه بنویسد.

چکیده

مقدمه و هدف: تغییر اپیدمیولوژی و کاهش حساسیت به آنتی بیوتیک های خط اول، مانند وانکومايسين و لینزولید، پزشکان را با گزینه های درمانی کمی برای عفونت های MRSA مواجه می کند. این مطالعه با هدف انجام یک **بررسی** اپیدمیولوژیک و بررسی تایپینگ مولکولی جدایه های MRSA انجام شده است.

روش شناسی پژوهش: در مجموع ۱۵۰ ایزوله MRSA از نمونه های بالینی جمع آوری شد. حساسیت ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار دیسک تعیین شد. ژن های مقاومت و ویروانس اصلی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز غربالگری شدند. برای انجام اپیدمیولوژی مولکولی از *SCCmec*، *agr typing*، *spa typing* و *dru typing* استفاده شد.

یافته های پژوهش: در این مطالعه، ۲۴ تایپ *dru* شناسایی شد. علاوه بر این، هشت تایپ جدید *dru* جدید شناسایی و در پایگاه داده ثبت گردید. دو کلاستر *dru* (11ce, 8i) در ایزوله های MRSA شناسایی شدند که فراوانی آنها ۸۳.۳ درصد بود. همچنین *SCCmec* تایپ III در ۶۳.۳ درصد (۹۵/۱۵۰) از ایزوله های MRSA یافت شد. فراوانی درصد تایپ های *spa* نشان می دهد که t030 و t037 در نمونه های بالینی مختلف غالب هستند.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه دو کلاستر *dru* (11ce, 8i) اکثر سویه ها را در مطالعه ما تشکیل می دهند، می توان نتیجه گرفت که منشاء ژنتیکی این سویه ها یکسان است. بنابراین، با نظارت موثر MRSA در بیمارستان ها و جامعه می توان از انتشار این سویه ها جلوگیری کرد.

کلید واژه: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین؛ ژنوتایپینگ؛ اپیدمیولوژی مولکولی، تایپینگ *dru*

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۲	فصل اول.....
۲	کلیات پژوهش.....
۲	۱-۱. مقدمه.....
۶	۲-۱. بیان مسئله.....
۹	۳-۱. اهداف پژوهش.....
۹	۱-۳-۱. هدف کلی.....
۹	۱-۳-۲. اهداف فرعی.....
۱۰	۴-۱. پرسش‌های پژوهش.....
۱۰	۱-۴-۱. پرسش اصلی.....
۱۰	۲-۴-۱. پرسش‌های فرعی.....
۱۱	۵-۱. اهمیت و ضرورت پژوهش.....
۱۱	۱-۵-۱. مبانی نظری.....
۱۱	۱-۵-۲. مبانی عملی.....
۱۲	۶-۱. تعریف‌های عملیاتی متغیرهای پژوهش.....
۱۳	۷-۱. نوآوری پژوهش.....
۱۴	فصل دوم.....
۱۴	مبانی نظری و پیشینه پژوهش.....
۱۵	۱-۲. مقدمه.....

۱۵	۲-۲ . مبانی نظری تحقیق
۱۵	۱-۲-۲ . استافیلوکوکوس اورئوس
۱۷	۲-۲-۲ . اپیدمیولوژی استافیلوکوکوس اورئوس
۲۳	۴-۲-۲ . علایم بالینی
۲۵	۵-۲-۲ . درمان استافیلوکوکوس اورئوس
۲۵	۶-۲-۲ . تشخیص آزمایشگاهی
۲۶	۷-۲-۲ . مکانیسم مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس
۲۹	۸-۲-۲ . جزایر بیماریزایی
۳۱	spa تایپینگ
۳۲	Agr regulatory
۳۵	dru typing
۳۷	۳-۲ . پیشینه در داخل کشور
۳۹	۴-۲ . پیشینه در خارج از ایران
۴۱	۵-۲ . جمع بندی
۴۳	فصل سوم
۴۳	روششناسی پژوهش
۴۸	۱-۳ . نوع مطالعه
۴۸	۲-۳ . حجم نمونه
۴۹	۳-۳ . روش نمونه گیری
۴۹	۴-۳ . معیارهای ورود به مطالعه
۴۹	۵-۳ . معیارهای خروج از مطالعه
۵۰	۶-۳ . روش جمع آوری اطلاعات

۵۰	۷-۳. روش اجراء.....
۵۰	۸-۳. تستهای تعیین هویت استافیلوکوکوس اورئوس.....
۵۰	۱-۸-۳. تست کاتالاز.....
۵۱	۲-۸-۳. تست کوآگولاز.....
۵۱	۳-۸-۳. آزمایش DNase.....
۵۲	۴-۸-۳. تست تخمیر مانیتول.....
۵۲	۵-۸-۳. ذخیره سازی باکتری.....
۵۳	۹-۳. ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی.....
۵۳	۱-۹-۳. غربالگری ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین.....
۵۴	۱۰-۳. انجام روشهای مولکولی.....
۵۴	۱-۱۰-۳. استخراج DNA.....
۵۵	۲-۱۰-۳. واکنش PCR ژن استافیلوکوکوس اورئوس.....
۵۵	۳-۱۰-۳. شناسایی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین با روش PCR.....
۵۶	۱۱-۳. تایپینگ مولکولی.....
۵۶	۱-۱۱-۳. روش <i>agr</i> تایپینگ.....
۵۷	۲-۱۱-۳. روش <i>spa</i> تایپینگ.....
۵۸	۳-۱۱-۳. روش <i>dru</i> تایپینگ.....
۵۸	۱۲-۳. روش تجزیه و تحلیل داده‌ها.....
۵۹	فصل چهارم.....
۵۹	یافته‌های پژوهش.....
۶۰	۱-۴. مقدمه.....
۶۰	۲-۴. درصد فراوانی بر اساس جنسیت.....

۳-۴	درصد فراوانی بر اساس نوع نمونه بالینی	۶۱
۴-۴	درصد فراوانی ایزوله ها در رده های سنی مختلف	۶۳
۵-۴	تعیین الگوی حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها	۶۴
۶-۴	فراوانی ژن های مقاومت و ژن های ویرولانسنس	۶۸
۷-۴	فراوانی تایپ های SCCmec	۷۰
۸-۴	نتایج تایپینگ <i>dru</i>	۷۱
۹-۴	نتایج تایپینگ <i>spa</i>	۷۵
۱۰-۴	نتایج تایپینگ <i>agr</i>	۷۷
	فصل پنجم	۱۶
	بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها	۱۶
۱-۵	مقدمه	۷۸
۳-۵	نتیجه گیری	۸۸
۴-۵	پیشنهادهای حاصل از پژوهش	۸۹
	منابع	۹۰

فهرست جداول

- جدول ۱-۱. ژنوتیپ های رایج مختلف *agr* در استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین ۳۴
- جدول ۱-۳. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه ۵۴
- جدول ۲-۳. برنامه حرارتی ترموسایکلر برای ژن *nuc*/استافیلوکوکوس اورئوس ۵۵
- جدول ۳-۳. برنامه حرارتی ترموسایکلر برای ژن *agr*/استافیلوکوکوس اورئوس ۵۶
- جدول ۴-۳. برنامه حرارتی ترموسایکلر برای استافیلوکوکوس اورئوس تایپینگ ۵۷
- جدول ۵-۳. برنامه حرارتی ترموسایکلر برای استافیلوکوکوس اورئوس تایپینگ ۵۸
- جدول ۱-۴. فراوانی جنسیت بیماران در دو گروه سرپایی و بستری ۶۰
- جدول ۲-۴. درصد فراوانی نوع نمونه بالینی در دو گروه سرپایی و بستری ۶۱
- جدول ۳-۴. فراوانی رده های سنی مختلف در دو گروه سرپایی و بستری ۶۳
- جدول ۴-۴. درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در دو گروه بستری و سرپایی (تمام اعداد با درصد نشان داده شدند) ۶۵
- جدول ۵-۴. درصد فراوانی فنوتیپ چندگانه مقاومت آنتی بیوتیکی MDR ایزوله های MRSA ۶۷
- جدول ۶-۴. درصد فراوانی ژن های مقاومت در دو گروه سرپایی و بستری ۶۸
- جدول ۷-۴. درصد فراوانی ژن های ویروالانس در دو گروه سرپایی و بستری ۶۹
- جدول ۸-۴. درصد فراوانی تیپهای مختلف SCCmec در دو گروه سرپایی و بستری ۷۰
- جدول ۹-۴. فراوانی تایپ های مختلف *dru* در بین انواع مختلف نمونه های بالینی ۷۳
- جدول ۱-۵. ویژگی های تایپ های مختلف *spa* در ایزوله های MRSA جدا شده در این مطالعه ۸۱
- جدول ۲-۵. ویژگی های مهم مشخص شده تایپ های مختلف *dru* در ایزوله های MRSA ۸۶

فهرست اشکال و نمودارها

- شکل ۱-۱ وظایف و عملکرد ژن های *agr* ۳۳
- شکل ۲-۱. نمای شماتیک از *dru VNTR* بر روی ژن *mecA* ۳۶
- شکل ۱-۳. تست کاتالاز جهت تفکیک استرپتوکوکوس از استافیلوکوکوس ۵۱
- نمودار ۱-۴. درصد فراوانی تعداد نمونه بر اساس انواع نمونه بالینی در دو گروه سرپایی و بستری. ۶۲
- نمودار ۲-۴. مقایسه درصد فراوانی تعداد ایزوله های MRSA در رده های سنی مختلف و نوع جنسیت در دو گروه سرپایی و بستری. ۶۴
- شکل ۱-۴. نتایج PCR برای ژن *dru* ۷۲
- شکل ۲-۴. شباهت بیست و چهار تاییپ *dru* در ۵۵ ایزوله MRSA توالی یابی شده. ۷۴
- شکل ۳-۴ نتایج PCR برای ژن *spa* ۷۵

فصل اول

کلیات پژوهش

۱-۱. مقدمه

استافیلوکوکوس‌ها^۱، باکتری‌های گرم مثبتی هستند که پوست و غشاهای مخاطی انسان و حیوانات را کلونیزه می‌کنند. با وجود اینکه استافیلوکوکوس‌ها جز فلور طبیعی بدن انسان هستند، گاهی اوقات فرصت طلب بوده و می‌تواند باعث بیماری‌زایی گردد. این باکتری‌ها باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها در میان انسان و حیوانات می‌شود. در میان استافیلوکوکوس‌ها، استافیلوکوکوس اورئوس^۲ مهاجم‌ترین گونه است و به عنوان یکی از عوامل پیش رو در ایجاد عفونت‌های باکتریایی در کشورهای در حال توسعه بوده و مسئول ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها، از یک عفونت کوچک پوستی تا پنومونی نکروزه کننده کشنده، می‌باشد (۱).

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین باکتری‌های اکتسابی از جامعه و یا مراکز بهداشتی و درمانی است. بروز سالانه آن در ایالات متحده آمریکا ۳۸/۲ تا ۴۵/۷ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال است (۲، ۳). در دیگر کشورهای توسعه یافته، میزان بروز تقریباً ۱۰ تا ۳۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال بوده، این میزان در برخی جمعیت‌ها مانند بیماران دیالیزی به مراتب بیشتر است (۴).

از جمله عوامل خطر موثر بر ابتلا به استافیلوکوکوس اورئوس شامل:

✓ استفاده از پروتزها و مواد خارجی: طی مطالعه انجام شده بر روی ۲۳۰۰ نفر مبتلا به این بیماری تقریباً بیش از نیمی از آنها از پروتزها و دستگاه‌های خارجی استفاده کرده بودند (۵). کاتترهای داخل عروقی شایع‌ترین علت ابتلا به استافیلوکوک اورئوس چه در بیماران بستری در بیمارستان و چه در جامعه می‌باشد (۶، ۷).

✓ تزریق مواد مخدر^۳ از دیگر عوامل خطر می‌باشد که معمولاً افراد جوان و به ظاهر سالم هستند. در واقع طی تحقیقات انجام شده مشاهده گردید که افراد تزریقی تعداد بیشتری استافیلوکوکوس اورئوس در بینی خود دارند (۸، ۹).

1. Staphylococcus

2. Staphylococcus aureus

3. Injection drug users

✓ عواملی که مربوط به خود میزبان می باشد مانند سن، جنس، قومیت و... نیز در ابتلا به استافیلوکوکوس اورئوس موثر می باشد به طوری که با افزایش سن میزان ابتلا به این باکتری افزایش می یابد (۱۰).

دو معضل اصلی در مواجهه با استافیلوکوکوس اورئوس بحث ابتلا مجدد و شکست درمان می باشد. امکان ابتلا مجدد به استافیلوکوکوس اورئوس بسیار شایع است در مطالعه‌ی کوهورتی که بر روی ۱۰۰۰۰ بیمار مبتلا انجام شد، تقریباً ۷ درصد بیماران مجدد به این بیماری مبتلا گردیدند که زمان متوسط عفونت مجدد در حدود ۱۵ ماه بود. عود مجدد باعث عوارض جدی از قبیل بیماری کلیوی، دیابت با عوارض همراه، بیماری شدید کبدی و پاراپلژی می گردد (۱۱). شکست درمان (یعنی مرگ در ۳۰ روز پس از درمان، یا تداوم باکتری در بیشتر از ۱۰ روز از شروع درمان یا عود مجدد باکتری در مدت ۶۰ روز بعد از قطع درمان) و بستری مجدد در بیمارستان در بیماران مبتلا به استافیلوکوکوس اورئوس به خصوص در عفونت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین^۱ (MRSA) شایع می باشد (۱۲).

میزان مرگ و میر استافیلوکوکوس اورئوس در حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد برآورد گردیده است (۱۳، ۱۴). مرگ و میر در MRSA در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین^۲ (MSSA) به مراتب بیشتر است (۱۵).

MRSA در سال ۱۹۶۱، اندکی پس از معرفی متی‌سیلین و شیوع این مقاومت در اوایل دهه ۱۹۶۰ گزارش شد (۱۶، ۱۷). از آن زمان MRSA در سراسر جهان گسترش یافته است، و شیوع آن در مراکز بهداشتی و درمانی و همچنین جامعه افزایش یافته است. به عنوان مثال، شیوع مقاومت به متی‌سیلین در بین ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس در بخش مراقبتهای ویژه در ایالات متحده ۶۰ درصد است (۱۸)، و بیش از ۹۰،۰۰۰ عفونت تهاجمی به دلیل MRSA در سال ۲۰۰۵ در ایالات متحده رخ داده است (۱۹).

^۱ . Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

^۲ . Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*

مقاومت به متی‌سیلین توسط PBP-2a، پروتئین اتصال دهنده پنی‌سیلین رمزگذاری شده توسط ژن استافیلوکوکوس اورئوس که به ارگانسیم اجازه می‌دهد در حضور متی‌سیلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام رشد کند، واسطه می‌شود. ژن استافیلوکوکوس اورئوس در یک عنصر ژنتیکی متحرک به نام کاست کروموزومی استافیلوکوکی¹ (SCCmec) قرار دارد. یک کلون واحد احتمالاً بیشتر ایزوله‌های MRSA کشف شده در دهه ۱۹۶۰ را به خود اختصاص داده است (۲۰-۲۲). تا سال ۲۰۲۰، یازده تایپ از ایزوله‌های MRSA شامل SCCmec تایپ I تا XI در سراسر جهان شناسایی شدند (۲۳-۲۵).

در طول دهه‌های اخیر روشهای تایپینگ فنوتیپی و ژنوتیپی متعددی، برای تشخیص شیوع و گسترش ایزوله‌های MRSA توسعه یافتند. روشهای سنتی فنوتیپی آزمایشگاه میکروبیولوژی شامل میکرودايلوشن برات، غربالگری آگاردايلوشن حاوی نمک (۴٪) و **اگراسیلین** (۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و غربالگری با دیسک سفوکسیتین می‌باشد (۲۶). امروزه روش‌های تایپینگ مولکولی بسیار کارآمدتر از روشهای قبلی می‌باشند. تکنیک‌های مولکولی که برای تایپینگ باکتری‌ها به کار می‌روند عبارتند از:

✓ PFGE²

✓ روش‌های متکی بر برش آنزیمی

✓ آنالیز پلاسمیدها

✓ روشهای تیپ بندی بر اساس PCR.

PFGE و *spa typing*³ روش‌های استاندارد طلایی برای تعیین بسیاری از گونه‌های باکتریایی محسوب می‌شوند. با وجود اینکه تکنیک‌های مذکور بسیار پر زحمت می‌باشند، ولی در حال حاضر تجهیزات مورد نیاز جهت انجام این تکنیک‌ها نه تنها در آزمایشگاه‌های مرجع یافت می‌شود بلکه در برخی از آزمایشگاه‌های پیشرفته بیمارستان‌ها هم در دسترس می‌باشد. همچنین روش تایپینگ برای سیستم *agr* برای باکتری **استافیلوکوکوس اورئوس** نیز دارای قدرت تفکیک بالایی بوده و کاربرد وسیعی نیز پیدا کرده است.

¹ Staphylococcal chromosome cassette mec

² Pulsed-field Gel Electrophoresis

³ *Staphylococcus aureus* protein A typing

پروتئین A یک جز اصلی در دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. آنالیز توالی نوکلئوتیدها در ناحیه X ژن کدکننده پروتئین A/استافیلوکوکوس اورئوس (*spa*) نشان داده است که این ناحیه از ۲۴ جفت باز تکراری تشکیل شده است. این ناحیه دارای پلی مورفیسم بالایی بوده و دارای توالی‌های منحصر به فرد و با تعداد متفاوت می‌باشد. تنوع و گوناگونی در ناحیه X باعث ایجاد باندهای متفاوت در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ناحیه متصل شونده به FC ایمونوگلوبولین‌ها ناحیه X نامیده می‌شود که با بررسی این ناحیه تفاوت بین سویه‌های اپیدمیک و غیر اپیدمیک مشخص می‌گردد.

تایپینگ مولکولی این پروتئین می‌تواند موجب جلوگیری از وقوع اپیدمی‌ها، کاهش تعداد عفونت‌ها و همین‌طور کاهش هزینه‌های ناشی از عفونت‌های بیمارستانی گردد. تکثیر ژن *استافیلوکوکوس اورئوس* (کدکننده آنزیم پروتئین A) روشی ساده و دقیق برای تایپینگ استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از منابع بالینی و بررسی الگوهای ژنی *spa* (پروتئین A) می‌باشد. در بسیاری از بیماری‌های انسانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس سیستم *agr* مسئول کنترل و هماهنگی تولید فاکتورهای ویروالانس، آگزوتوکسین‌های ترشحی و همولیزین‌ها می‌باشد.

این سیستم متشکل از دو جز است:

- ✓ لوکوس *agr* که رفتارش وابسته به تراکم سلول باکتری است (پدیده Quorum sensing).
 - ✓ ترشح پپتید خود القاگر (auto inducer peptide) که به جمعیت باکتری این امکان را می‌دهد که به یک غلظت آستانه یا بحرانی برسند.
- لوکوس *agr* از دو واحد رونویسی مختلف تشکیل شده است: RNAII و RNAIII که توسط پروموتورهای p2 و p3 از هم متمایز می‌شوند.

اپران p2 مسئول کد کردن چهار پروتئین AgrA, AgrB, AgrC و AgrD است.

پپتید خود القاگر دارای یک حلقه تیولاکتونی است که باعث فعال شدن دو پروموتور p2 و p3 می‌شود (۲۷-۲۹).

۲-۱. بیان مسئله

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایعترین عوامل بیماریزای انسانی و مهمترین عامل عفونتهای بیمارستانی محسوب می‌شود (۳۰). شیوع بالای عفونتهای ناشی از سویه‌های MRSA در این باکتری در دهه گذشته در محیط‌های بیمارستانی و کنترل و درمان سخت عفونتهای ناشی از این عوامل، MRSA را تبدیل به یکی از مشکلات بزرگ **درمانی** در سراسر جهان کرده است (۳۰، ۳۱). متی‌سیلین یک پنی‌سیلین نیمه‌سنتزی مقاوم در برابر بتالاکتاماز است که در سال ۱۹۵۹ کشف گردید. شیوع عفونت ایزوله‌های MRSA در اوایل دهه ۱۹۶۰ در اروپا رخ داد و بعد از آن در سراسر جهان گسترش یافت (۱۷).

در ابتدا ایزوله‌های MRSA فقط در بیمارستانها (^۱HA-MRSA) مد نظر قرار می‌گرفت، اما در اواخر دهه ۱۹۹۰ اولین MRSA مرتبط با جامعه (^۲CA-MRSA) نیز شناسایی گردید و به سرعت در جهان منتشر شد (۳۲). به همین دلیل امروزه بین سوش‌های CA-MRSA و سوش‌های HA-MRSA که اکثراً به دلیل مقاومت چند دارویی موجب چالش **هستند**، یک مرز مشخص قائل می‌شوند. مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس‌ها به متی‌سیلین به علت حضور یک ژن بنام *mecA* است که موجب کد کردن یک پروتئین ثانویه ۷۸ کیلودالتونی باند شونده به پنی‌سیلین بنام PBP2a می‌شود (۳۲).

در مقایسه با سایر PBP2a، PBPs سطح تمایل کمتری برای اتصال به تمام آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام را دارا می‌باشد. که این امر منجر می‌گردد که حضور آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نتواند در سنتز لایه‌های پپتیدوگلیکان اختلال بوجود بیاورد و بدین ترتیب باکتری به حیات خود ادامه می‌دهد. ژن *mecA* در میان اپرون *mec* به‌مراه ژن‌های تنظیمی آن *mecR1* و *mecI* واقع شده است. اپرون *mec* توسط کاست‌های کروموزومی استافیلوکوک **رک** حمل می‌شود (۳۲، ۳۳).

پروتئین A^۳ جزیی از فاکتورهای ویروالانس بسیار مهم استافیلوکوکوس اورئوس در بیماریزایی محسوب می‌شود و نقش بسیار مهمی در پاتوژنز این باکتری دارد، که با اتصال به قسمت FC از

^۱ Healthcare-Acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

^۲ Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*

^۳Protein A or immunoglobulin G binding protein A

آنتی‌بادی عملکرد خود را انجام می‌دهد و باکتری را از اپسونیزاسیون حفظ می‌کند. این فاکتور دارای ساختار پروتئینی بوده و از ۵۰۸ اسید آمینه ساخته شده وزن تقریبی ۴۲ کیلودالتون است که در پپتیدوگلیکان باکتری جای می‌گیرد و وظیفه اتصال به ناحیه FC از آنتی‌بادی‌ها را دارد. پروتئین A دارای ۲۱۵۰ نوکلوتید است و یک ناحیه دارای تغییرات بالا تحت عنوان ناحیه X که در واقع یک دنباله کوتاه تکرار شونده^۱ می‌باشد. این ناحیه به FC آنتی‌بادی متصل می‌شود که در انتهای C ترمینال از پروتئین A قرار می‌گیرد و باعث اتصال آن به دیواره پپتیدوگلیکان می‌شود. این ناحیه دارای دارای توالی‌های تکراری ۸ تا ۱۲ تایی می‌باشد که در یک پروتئین A نسبت به دیگری متفاوت می‌باشد که از همین تفاوت در جهت تایپینگ/استافیلوکوکوس اورئوس به نام *spa* تایپینگ مورد استفاده قرار می‌گیرد. این طبقه‌بندی اپیدمیولوژیک/استافیلوکوکوس اورئوس و ارتباط این باکتری در نقاط مختلف جغرافیایی به ما بسیار کمک می‌کند. این روش تایپینگ در مقایسه با روش تایپینگ قدیمی استافیلوکوکوس اورئوس، قدرت تمایز و حساسیت بسیار بهتری دارد. همچنین این روش تایپینگ می‌تواند هم میزان شیوع دو *ایزوله* از استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان‌ها و ارتباط آنها را نسبت به هم نشان دهد، و هم در تشخیص کلون‌های باکتری و همچنین منابع اپیدمیک عفونت بسیار کمک کننده باشد. روش *spa* تایپینگ در واقع آنالیز^۲ (VNTR) می‌باشد که تفاوتی از ژن *spa* را که در اثر جهش نقطه‌ای ایجاد شده را به خوبی نشان می‌دهد و روش مناسب برای بررسی شیوع عمومی یا موضعی استافیلوکوکوس اورئوس در یک منطقه می‌باشد. اساس روش مذکور آنالیز توالی تکراری ناحیه *spa* است که یک روش ارزان قیمت بوده و به راحتی در دسترس می‌باشد و اطلاعات بسیار قوی در مورد تعیین روابط اپیدمیولوژیک و فیلوژنیک به ما می‌دهد (۳۴، ۳۵).

¹ . short sequence repeat

² . variable number of tandem repeats

اخیراً درون ناحیه کاست کروموزومی ژن *mec* نیز یک تکرار ۴۰ جفت بازی پشت سر هم با بازهای متغیر یا واحد تکراری مستقیم^۱ (*dru*) شناسایی شده است که به علت توانایی بالا در تمایز دادن کلون های EMRSA-15 و EMRSA-16 دو ایزوله ای که توسط سایر روش ها قابل تمایز نیستند، مورد توجه قرار گرفته است. در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، *dru* در مجاورت مناطق IS431 در ناحیه *SCCmec* در تجزیه و تحلیل اپیدمیولوژیک سویه های اپیدمی بسیار یکسان و در ردیابی افقی حرکت *SCCmec* مفید می باشد. استفاده موثر از روش تایپینگ *dru* توسط یک سیستم یکسان نامگذاری تسهیل شده است. یکی از مزیت های مهم این روش تایپینگ این است که داده های جدید تولید شده را می توان در یک پایگاه داده مشترک بین المللی فهرست بندی و مقایسه نمود (۳۶، ۳۷).

لکوس *agr* نقش مهمی در کنترل بیان فاکتورهای ویرولانسی استافیلوکوکوس اورئوس ایفا می کند. لکوس *agr* حاوی دو نسخه رونویسی مختلف RNAII و RNAIII است که توسط پروموتورهای P2 و P3 کنترل می شوند. اپرون P2 دارای چهار ژن *agrA*، *agrB*، *agrC* و *agrD* می باشد. *agrB* و *agrD* پیش ساز پپتید خودالقایی (AIP) بوده و *agrC* و *agrA* به ترتیب حسگر غشایی و تنظیم کننده پاسخ هستند. در شرایطی که تراکم باکتری بالا باشد، AIP افزایش یافته و با برهمکنش با *agrC* موجب فعال شدن *agrA* می گردد. *agrA* یک پروتئین اتصالاتی به DNA است که قادر است پروموتورهای P2 و P3 را فعال نماید. وجود چهار گروه تخصصی (*agr* IV, III, II, I) در استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل پلی- مورفیسم در توالی اسیدهای آمینه (*AgrD*) و گیرنده مرتبط با آن (*agrC*) می باشد. گروه های اختصاصی *Agr* با عفونت ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس مرتبط هستند، به طوری که ایزوله های حاوی *agrIV* با سندرم اکسفولیاتیو ژنرالیزه، ایزوله های حاوی *agrIII* با تولید توکسین TSST-1 مرتبط هستند. همچنین ایزوله های ایجاد کننده اندوکاردیت عمدتاً دارای گروه های *AgrI* و *AgrII* و ایزوله های حاوی گروه های *AgrI* عمدتاً در ارتباط با بیماریهای تهاجمی به ویژه باکتری می باشند (۳۸، ۳۹).

¹ . Direct Repeat Unit

در این بررسی ما بر آن شدیم تایپینگ مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه های بستری و سرپایی بیمارستان آموزشی الزهرای اصفهان را با استفاده از روش های *agr, spa, dru* بررسی نماییم.

۳-۱. اهداف پژوهش

۱-۳-۱. هدف کلی

تعیین تایپینگ مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های بستری و سرپایی بیمارستان آموزشی الزهرای اصفهان با استفاده روش های *spa, dru, agr* در سال ۱۳۹۸

۱-۳-۲. اهداف فرعی

۱. تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بستری
۲. تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های سرپایی
۲. تعیین فراوانی نسبی ایزوله‌های MRSA در نمونه‌های بستری و سرپایی
۳. تعیین تایپ مولکولی ایزوله‌های منتخب *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش *dru* تایپینگ
۴. تعیین تایپ مولکولی سویه های منتخب *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش *spa* تایپینگ
۵. تعیین و دسته بندی سویه های منتخب *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش *agr* تایپینگ
۶. تعیین ارتباط بین تایپ های *agr* و مقاومت آنتی بیوتیکی
۷. تعیین ارتباط بین تایپ‌های *spa, agr, dru*

۱-۴. پرسش‌های پژوهش

۱-۴-۱ پرسش اصلی

تایپینگ مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های بالینی با استفاده روش‌های *spa*، *agr* و *dru* چگونه است؟

۱-۴-۲ پرسش‌های فرعی

۱. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بستری و سرپایی چگونه است؟

۲. فراوانی نسبی ایزوله‌های MRSA در نمونه‌های بستری و سرپایی چقدر است؟

۳. آیا در میان ایزوله‌های منتخب استافیلوکوکوس اورئوس تایپ‌های جدید شناسایی می‌شود؟

۴. در تایپینگ *spa*، چند نوع تایپ دیده می‌شود و تایپ غالب در بین ایزوله‌های جدا شده چه نوعی است؟

۵. فراوانترین تایپ *agr* در بین ایزوله‌های جدا شده کدام است؟

۶. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به کدام تایپ از *agr* است؟

۱-۵. اهمیت و ضرورت پژوهش

در سال های اخیر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به عنوان یکی از پاتوژن های اصلی در بیمارستان ها و همچنین عفونت های اکتسابی از جامعه شناخته شده است. با وجود پیشرفت تکنولوژی و درمان دارویی، عفونت های ایجاد شده به وسیله گونه MRSA هنوز به عنوان عامل پاتوژن سخت به شمار می آید. سویه ها MRSA دارای ماهیتی چند مقاومتی بوده و باعث ایجاد مقاومت همزمان به آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها و ماکرولیدها می شوند. این ارگانسیم ها عامل بیماری شدید و مرگ و میر در سراسر جهان با الگوی مقاومت چند گانه دارویی هستند، که این امر درمان عفونت استافیلوکوکی را با چالش مواجه کرده است. سالانه حدود ۱۹۰۰۰ مرگ و میر در آمریکا به علت سویه های MRSA اتفاق می افتد و حدود ۳ میلیارد دلار هزینه برای سیستم بهداشت و درمان آمریکا دارد (۴۰). به دلیل شدت بیماریزایی این باکتری و هزینه های بالای درمان، کنترل و پیشگیری، تعیین تایپ غالب مولکولی به منظور شناسایی خصوصیات آن ضروری به نظر می رسد. الگوی مقاومت دارویی و تعیین مولکولار تایپ های در حال چرخش در بخشهای مهم بیمارستان از جمله بخش ICU در کشورمان مستلزم به روزرسانی و نظارت های دوره ای است (۴۱، ۴۲).

۱-۵-۱. مبانی نظری

آگاهی درمورد اپیدمیولوژی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و شیوع انتشار ژن های مقاومت برای کنترل عفونت های بیمارستانی مفید است. اگرچه مطالعات زیادی در خصوص استافیلوکوکوس های مقاوم انجام گرفته است اما اطلاعات کمی درمورد نوع سویه های MRSA و مقاومت آنها به خصوص در داخل کشور با استفاده از روش *Dru* تایپینگ وجود دارد.

۱-۵-۲. مبانی عملی

با تعیین ایزوله های MRSA تایپینگ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با روش های معتبر و قوی، از یک طرف الگوی اپیدمیولوژیک باکتری در مناطق مشخص می گردد و می تواند در وقوع جلوگیری از اپیدمی ها کمک کند. همچنین باعث می شود به پزشکان در درمان بیماران کمک

گردد و از طرف دیگر می‌تواند برای کاهش مدت زمان بستری شدن بیماران و جلوگیری از مصرف داروهای غیر موثر به کار رفته و به این ترتیب باعث افزایش موفقیت در درمان و کاهش عوارض درمانی و نیز صرفه جویی در هزینه های درمانی شود.

۱-۶. تعریف‌های عملیاتی متغیرهای پژوهش

MRSA ✓

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین است که می‌تواند به سایر رده های آنتی بیوتیکی غیر از بتالاکتامها نیز مقاوم شود (۴۳).

MSSA ✓

استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین است که به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها حساس است (۴۴).

HA-MRSA ✓

سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که منشا آنها از بیمارستان می‌باشد (۴۳). میزان شیوع این سویه ها با عوامل مختلفی از قبیل بزرگی بیمارستان، بخش بستری شده مرتبط است (۴۵).

CA-MRSA ✓

سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که منشا آنها از جامعه می باشد. میزان شیوع این سویه ها با عوامل مختلفی از قبیل بزرگی فرهنگ و آداب، تراکم جمعیت منطقه مرتبط است (۴۳).

dru تایپینگ ✓

ناحیه کاست کروموزومی ژن *mec* نیز یک تکرار ۴۰ جفت بازی پشت سر هم با بازهای متغیر یا واحد تکراری مستقیم

spa تایپینگ ✓

یکی از فاکتور های متمایز کننده در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است که در ژن کد کننده خود، دارای ناحیه پلی مورفیسم X با توالی کوتاه می‌باشد. این ژن کد کننده پروتئین A می‌باشد

که از جمله پروتئین‌های سطحی در *استافیلوکوکوس اورئوس* است که علاوه بر این که از عوامل ویرولانسی باکتری محسوب می‌شود، جهت تعیین هویت اختصاصی نیز استفاده می‌گردد (۴۶).

Agr regulatory ✓

در بسیاری از بیماری‌های انسانی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، سیستم *استافیلوکوکوس اورئوس* مسوول هماهنگی تولید فاکتورهای ویرولانسی، آگزوتوکسین‌های ترشحی و همولیزین‌ها می‌باشد. که متشکل از دو سیستم: ۱- لوکوس Agr ۲- پپتید خودالقاگر است (۴۷).

استافیلوکوکوس اورئوس

کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهم‌ترین گونه در جنس *استافیلوکوکوس* از نظر پزشکی محسوب می‌شود.

۷-۱. نوآوری پژوهش

- ✓ انجام سه روش تایپینگ برای سویه‌های MRSA جدا شده از بیمارستان الزهراء اصفهان
- ✓ مقایسه تایپینگ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیمارستان الزهراء اصفهان
- ✓ استفاده از روش *dru* تایپینگ در ایران

فصل دوم

مبانی نظری و پیشینه پژوهش

۱-۲. مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های مهم باکتریایی است که بیماری‌زایی آن در جامعه و بیمارستان از اهمیت بسزائی برخوردار می‌باشد. این باکتری قسمتی از فلور طبیعی انسان بوده که در مجاری تنفسی فوقانی ۲۵٪ افراد وجود دارد و باعث طیف وسیعی از بیماری‌ها، از عفونت‌های پوستی تا عفونت‌های بسیار شدید و مهاجم شامل سپتیمی، اندوکاردیت، پنومونی و آبسه‌های عمیق پوستی می‌شود (۴۸). مطالعات انجام شده در آمریکا، کانادا و اروپا نشان می‌دهد که استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۲٪ عفونت‌های خونی، ۲۳/۲٪ عفونت‌های تنفسی تحتانی و ۳۹/۲٪ عفونت‌های پوستی را تشکیل می‌دهد (۴۹). استافیلوکوکوس اورئوس دارای فاکتورهای ویروانس متعددی شامل ادهسین‌ها، سیتوکین‌ها، سوپر آنتی‌ژن‌ها، آگزو توکسین، آنزیم‌ها و کپسول پلی ساکاریدی می‌باشد که در پاتوژنیسته این باکتری نقش دارند (۴۸).

۲-۲. مبانی نظری تحقیق

۱-۲-۲. استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس‌ها متعلق به خانواده میکروکوکاسه می‌باشند، این باکتری‌ها کوکسی‌های گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری که در جهات مختلف تقسیم و آرایش خوشه انگوری را ایجاد می‌کنند. گرچه برخی سلول‌ها به صورت تکی، دوتایی و زنجیره‌ای کوتاه نیز دیده می‌شوند. همچنین استافیلوکوکوس‌ها مانند سایر کوکسی‌های فلاژل ندارند، غیرمتحرک‌اند و تشکیل اسپور نمی‌دهند. استافیلوکوکوس‌ها در شرایط هوازی به خوبی رشد می‌کنند، اما بی‌هوازی اختیاری‌اند و می‌توانند کربوهیدرات‌های مختلفی را اکسید یا تخمیر کنند. واژه استافیلوکوکوس از دو واژه یونانی استافیل، به معنای خوشه و کوکوس به معنای دانه تشکیل شده، و به دلیل اینکه این باکتری گرد بوده و شبیه خوشه انگور کنار هم قرار می‌گیرند، به آن‌ها استافیلوکوک گفته می‌شود (۵۰). استافیلوکوکوس اورئوس در دهه ۱۸۸۰ کشف شد. در اوایل دهه ۱۹۴۰ پیش از معرفی پنی‌سیلین برای استفاده‌های درمانی، مرگ و میر ناشی از عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس تقریباً ۸۰ درصد بود، در ۱۹۴۲ دو سال بعد از استفاده از پنی‌سیلین برای استفاده‌های درمانی اولین ایزوله استافیلوکوکوس مقاوم به پنی‌سیلین در بیمارستان یافت شد. الکساندر

اوگوستن یک جراح اسکاتلندی بود که در سال ۱۸۸۰ توانست عامل ایجاد چرک را کشف کند. او آبنه های چرکی بیماران را باز کرد و ترشحات چرکی آبنه ها را رنگ آمیزی و در زیر میکروسکوپ بررسی کرد. وی زنجیره های از ارگانیسیم های کوکوس خوشه انگور را در میان سلول های چرکی مشاهده کرد. اوگوستن نام استافیلوکوک (به معنای خوشه انگور) را برای این ارگانیسیم ها برگزید (۵۰). استافیلوکوکوس ها در همه جا یافت می شوند آنها از رایج ترین ارگانیسیم ها در پزشکی می باشند و مسئول بیش از ۸۰ درصد عفونت های چرکی هستند، که در عفونت بالینی یافت می شود و بعد از اشرشیاکلی دومین علت عفونت های بیماران بستری در بیمارستان را به خود اختصاص می دهند (۵۰). از آنجایی که سوش های جوان در عفونت های استافیلوکوکی، پیگمان زرد را تولید می کنند، این ارگانیسیم ها تحت عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* نامیده می شوند، تا اینکه از سوش هایی با قدرت بیماری زایی کمتر (استافیلوکوک های تولید کننده کلونی سفید) متمایز شوند. تولید پیگمان ویژگی متغیری در استافیلوکوکوس ها می باشد و ارتباط آن با بیماری زایی قطعی نمی باشد. امروزه توانایی تولید کواگولاز جایگزین نوع پیگمان در کلونی ها به عنوان معیار نسبی دال بر بیماری زایی شده است. توانایی تولید کواگولاز مفید ترین معیار تشخیص برای *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد (۵۱). به طور معمول این باکتری نسبت به خشک شدن و بعضی داروها و آنتی سبتیک ها مقاوم می باشد و به سهولت از طریق دست ها لباس ها و تجهیزات پزشکی به بیماران منتقل می شود. بنابراین مقاومت و زنده ماندن این ارگانیسیم در محیط بیمارستان باعث منتقل شدن به افراد حساس از قبیل نوزادان تازه متولد شده افراد با ضعف سیستم ایمنی و افراد دارای سوختگی می شود (۵۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از باکتری های مهم اکتسابی از بیمارستان ها و جامعه می باشد. بیمارانی که به این باکتری مبتلا می گردند، می توانند طیف گسترده ای از عوارض را ایجاد کنند که در ابتدا تشخیص آن دشوار می باشد و همین باعث می شود که عوارض شدید تر شود (۱۳, ۱۴).

۲-۲-۲. اپیدمیولوژی استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین باکتری‌های اکتسابی از جامعه و یا مراکز بهداشتی و درمانی است. بروز سالانه استافیلوکوکوس اورئوس در ایالات متحده آمریکا ۳۸/۲ تا ۴۵/۷ در هر ۱۰۰۰۰۰ هزار نفر در سال است (۲، ۳). در دیگر کشورهای توسعه یافته، میزان بروز تقریباً ۱۰ تا ۳۰ در ۱۰۰۰۰۰ هزار نفر در سال بوده، این میزان در برخی جمعیت‌ها مانند بیماران دیالیزی به مراتب بیشتر است (۴).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با دو منشا مراکز بهداشتی و درمانی و همچنین جامعه از نظر اپیدمیولوژی مولکولی و بالینی متفاوت هستند.

❖ استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین مرتبط به مراکز بهداشتی و درمانی (HA-MRSA):

به عفونتی گفته می‌شود که بیشتر از ۴۸ ساعت از بستری یا ۱۲ ماه بعد از مواجهه با مراکز بهداشتی - درمانی (بستری شدن، اقامت طولانی، جراحی، دیالیز) به وجود آید (۱۹). HA-MRSA با بیماری شدید تهاجمی از جمله عفونت پوست و بافت نرم، عفونت جریان خون (BSI) و ذات الریه همراه است (۱۹، ۵۲، ۵۳). در حقیقت، MRSA عامل اصلی عفونت محل جراحی در بیمارستانهای دولتی و خصوصی می‌باشد (۵۴، ۵۵).

HA-MRSA از دهه ۱۹۶۰ به بعد در محیط‌های بیمارستان باعث ایجاد مشکلات زیادی گردیده است، واز آن زمان به تدریج افزایش شیوع مقاومت ضد میکروبی در عفونت استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از بیمارستان مشاهده شده است (۵۳، ۵۶، ۵۷). طبق گزارش سیستم مراقبتی ایالات متحده آمریکا بیش از ۲۴ هزار مورد استافیلوکوکوس اورئوس وجود داشته است که میزان مقاوم به متی‌سیلین ها از ۲۲ درصد در سال ۱۹۹۵ به ۵۷ درصد در سال ۲۰۰۱ رسیده است (۵۳). میزان سویه مقاوم این باکتری با منشا بیمارستانی در ایالات متحده آمریکا از سال ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۲، سالانه ۱۷ درصد کاهش یافته است (۵۸). بین سالهای ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۷، سیستم بهداشتی-درمانی ایالات متحده آمریکا با انجام مداخلات چند جانبه کنترل کننده تا میزان ۴۳ درصد عفونت استافیلوکوکوس اورئوس را کاهش دادند

(۵۹). در کل شیوع HA-MRSA در جهان از یک درصد در اسکاندیناوی تا ۴۰ درصد در ژاپن، فلسطین اشغالی و کشورهای اروپایی متفاوت است (۶۰, ۶۱).

MRSA یکی از معدود عوامل بیماری‌زا است که به طور معمول تقریباً در هر نوع عفونت به دست آمده در بیمارستان نقش دارد، این احتمالاً تا حدودی به ظرفیت ارگانسیم برای تشکیل بیوفیلم در دستگاههای تهاجمی خارجی مانند لوله‌های تراشه و مجاری ادراری و کاتترهای داخل عروقی مرتبط است (۶۲). بیوفیلم بقا و تکثیر MRSA را از طریق کاهش مدت زمان قرار گرفتن ارگانسیم‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها و همچنین ترویج فرصت بالقوه برای انتقال ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی بین موجودات زنده، تسهیل می‌کند (۶۳).

عوامل خطر عفونت HA-MRSA شامل استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، بستری شدن طولانی‌مدت، همودیالیز، بیماری‌های زمینه‌ای مانند دیابت، ایدز و ضعف سیستم ایمنی و انتقال از محیط و پرسنل بیمارستان می‌باشند (۶۴-۶۶). بدیهی است که بیمارانی که به نوع مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس مبتلا هستند نسبت به کسانی که به گونه حساس مبتلا هستند، مدت زمان بستری بیشتر در بیمارستان و هزینه‌های درمانی بیشتری دارند (۵۲, ۶۷-۷۰). به طور مثال در دو مطالعه متاآنالیز که بر روی ۴۰۰۰ هزار بیمار مبتلا به عفونت جریان خون انجام گرفت، مرگ در افراد مبتلا به MRSA ۱/۵ تا ۲ برابر بیشتر از افراد MSSA بود (۵۲, ۷۱). بیماران مبتلا به عفونت ناشی از MRSA همچنین میزان بالاتری از نارسایی حاد کلیوی، بی‌ثباتی همودینامیک و وابستگی طولانی مدت به ونتیلاتور نسبت به بیماران مبتلا به عفونت به دلیل MSSA دارند (۶۸).

❖ استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین مرتبط با جامعه (CA-MRSA):

مواردی از MRSA که منشا آنها از مراکز بهداشتی-درمانی نباشد (۱۹). CA-MRSA اغلب در افراد جوان و دیگر افراد سالم با عفونت‌های پوستی و بافت نرم همراه است (۶۳). بیشتر سویه‌های CA-MRSA نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام حساس هستند، اگرچه مقاومت چند داروی در مردان همجنسگرا دیده شده است (۷۲، ۷۳). این سویه حاوی پلاسمید pUSA03 است و ژنهای مقاومت در برابر بتالاکتامها^۱، فلوروکینولونها^۲، تتراسایکلین^۳، ماکرولیدها^۴، کلیندامایسین^۵ و موپیروسین^۶ را به همراه دارد.

CA-MRSA ابتدا در اوایل دهه ۱۹۸۰ در بین مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی گزارش شد (۷۴) و از آن زمان شایع‌ترین علت عفونت‌های پوستی و بافت نرم^۷ (SSTI) است که به بخش‌های اورژانس و کلینیک‌های سرپایی ایالات متحده مراجعه می‌کنند (۷۵، ۷۶). این موضوع با یک مطالعه آینده‌نگر از ۴۲۲ بیمار مبتلا به SSTI که در بخش‌های اورژانس در آگوست ۲۰۰۴ دیده می‌شدند، نشان داده شد. استافیلوکوکوس اورئوس در ۷۶ درصد موارد دیده شد، ۹۷ درصد از این ایزوله‌ها باکتری CA-MRSA USA300 و ۹۸ درصد دارای ژن سموم لکوسیدین لانوسیدین Panton-Valentine بودند (۷۶). به نظر می‌رسد USA300 نسبت به سایر پیشینه‌های ژنتیکی استافیلوکوکوس اورئوس در بین اعضای خانواده قابل انتقال‌تر است (۷۷).

طغیان بیماری در چندین محیط گزارش شده است، از جمله اجتماعات بومی، تیم‌های ورزشی، مراکز مراقبت از کودکان، پرسنل ارتش، مردان همجنسگرا و زندانیان زندان و نگهداران بودند (۵۵، ۵۶، ۷۲، ۸۰-۷۸). این مشاهدات منجر به شناسایی برخی از عوامل خطر با ارزش پیش‌بینی نسبتاً ضعیف برای CA-MRSA شده است. این موارد شامل آسیب‌های پوستی (به عنوان مثال، شستشو، ساییدگی، خال

1. beta-lactams

2. fluoroquinolones

3. tetracycline

4. macrolides

5. clindamycin

6. mupirocin

7. skin and soft tissue infections

کوبی، استفاده از مواد مخدر تزریقی)، تراشیدن مواد آرایشی بدن، حبس کردن، تجهیزات به اشتراک گذاری است که بین کاربران تمیز یا شسته نشده است و تماس نزدیک با دیگران که عفونت MRSA دارند (۷۲، ۸۳-۸۱). حیوانات همچنین می‌توانند MRSA را حمل کرده و به عنوان منبع انتقال عمل کنند (۸۱، ۸۴، ۸۵). نکته مهم، بسیاری از بیماران مبتلا به CA-MRSA هیچ فاکتور خطری ندارند (۸۶). پوست و بافت نرم باقی مانده از عفونت CA-MRSA است، اگرچه این بیماری همچنین می‌تواند باعث ایجاد بیماری تهاجمی و شدید مانند پنومونی نکروز کننده، استئومیلیت، عفونت مجاری ادراری، اندوکاردیت عفونی و سپسیس (با یا بدون سندرم واترهاوس-فریدریشن) شود (۶۸، ۸۷-۸۹).

❖ مشاهدات اپیدمیولوژیک:

طبقه بندی‌های CA-MRSA و HA-MRSA دیگر مجزا نیستند زیرا افراد ناقل می‌توانند کلنی MRSA را هم در محیط بیمارستان و هم در اجتماع منتقل نمایند (۸۶، ۹۰-۹۲). یک مطالعه شامل ۴۱۲ بیمار مبتلا به باکتریای استافیلوکوکوس اورئوس که از عفونتهای خونریزی دهنده بیمارستان ناشی از سویه USA300 به دست آمده در جامعه احتمالاً با کلینزاسیون بدست آمده در بیماران بستری در ارتباط هستند (۹۳).

با آغاز شیوع باکتری در جامعه، عفونت‌های HA-MRSA با افزایش فراوانی در بین بیماران در محیط های جامعه مشاهده شده است. که در یک مطالعه ۲۰۹ بیمار مرخص شده از مراقبت در بیمارستان نشان داده شد، طی ۱۸ ماه پس از ترخیص بیمارستان، ۴۹ درصد از عفونت‌های MRSA جدید در خارج از بیمارستان آغاز شد (۹۴). در مطالعه دیگر ۱۰۲ بیمار مبتلا به عفونت‌های CA-MRSA، ۲۹ درصد تایپ های مولکولی مطابق با HA-MRSA بودند (۹۵). همچنین، بیماران مبتلا به عفونت MRSA به دلیل سویه‌های "مرتبط با جامعه" نیز با افزایش فراوانی در بین بیماران در محیط بیمارستان مشاهده شده است. سویه‌های CA-MRSA همچنین ممکن است باعث شروع عفونت در بیمارستان، عفونت های مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی شود، زیرا ممکن است بیمارانی که با کلینزاسیون با CA-MRSA که در جامعه وجود دارند، ممکن است نیاز به بستری شدن در بیمارستان داشته باشند یا این سری

گونه‌ها را به سایر بیماران بستری منتقل کنند یا در هنگام بستری دچار عفونت شوند (به عنوان مثال بعد از جراحی یا قرار دادن وسیله تهاجمی) (۹۶). در بررسی ۳۵۲ بیمار مبتلا به "MRSA مرتبط با مراقبت های بهداشتی"، نسبت ایزوله ها با تایپ مولکولی CA-MRSA از ۱۷ تا ۵۶ درصد بین سالهای ۱۹۹۹ و ۲۰۰۴ افزایش یافته است (۹۷).

تفاوت اپیدمیولوژیک بین HA-MRSA و CA-MRSA همچنین توسط گزارش شبکه نظارت بر باکتری فعال ایالات متحده از ۸۹۸۷ عفونت MRSA تهاجمی در سال ۲۰۰۵ نشان داده شده است. در این گزارش، میزان آلودگی MRSA تهاجمی ۳۲ در ۱,۰۰۰,۰۰۰، بروز MRSA در میان بیماران ≥ 65 سال، ۱۲۸ در ۱,۰۰۰,۰۰۰ و میزان مرگ و میر ۶.۳ در ۱,۰۰۰,۰۰۰ بود (۱۹). با توجه به این داده‌ها، نویسندگان تخمین زدند که در سال ۲۰۰۵ در آمریکا، ۹۴۳۶۰ مورد عفونت تهاجمی MRSA با ۱۸۶۵۰ فوت وجود داشته است. از این تعداد، ۲۷ درصد آلودگی‌های HA-MRSA با شروع در بیمارستان، ۵۸ درصد با مراقبت‌های بهداشتی همراه بودند و طی یک سال از یک روش پزشکی استفاده کرده بودند، که ۱۴ درصد از آنها عفونت های اکتسابی در جامعه بودند. نویسندگان نتیجه گرفتند که عفونت های MRSA در درجه اول به مراقبت های بهداشتی مربوط می شوند اما دیگر محدود به بخش های مراقبت های ویژه، بیمارستان های مراقبت های حاد یا هر موسسه مراقبت های بهداشتی نیستند. علاوه بر این، CA-MRSA ممکن است جایگزین سویه های به دست آمده در بیمارستان شود (۹۳).

❖ کلونیزاسیون MRSA

کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس به دنبال روشهای تهاجمی پزشکی یا جراحی، خطر ابتلا به عفونت استافیلوکوکی را افزایش می‌دهد. در بیمارستان جهت غربالگری بیماران و تشخیص، بیشتر روی پرستاران تمرکز گردیده است، چرا که پرستاران محل کلونیزاسیون اولیه این پاتوژن هستند. با این حال، برخی از افراد فقط کلونیزاسیون MRSA در گلو را دارند، بنابراین در غربالگری معمول بینی تشخیص داده نمی‌شود. در یک مطالعه شامل ۳۴۶۴ بیمار سوئیسی، ۴۸ درصد از افراد ناقل استافیلوکوکوس اورئوس بودند. که ۱۲ درصد آنان کلنی را در گلو داشتند (۹۸). در بین کارکنان بهداشتی و درمانی شیوع کلونیزاسیون MRSA بین ۴ تا ۱۵ درصد است (۹۹, ۱۰۰).

۲-۳. عوامل خطر استافیلوکوکوس اورئوس

افزایش چشمگیر شیوع MRSA در بیمارستان و اجتماعات به عوامل مختلفی نسبت داده شده است. عوامل خطر برای MRSA مرتبط با مراقبت های بهداشتی و MRSA مرتبط با جامعه قبلاً شرح داده شده است. بحث های مفصل تر مربوط به استفاده از آنتی بیوتیک ها، افراد آلوده HIV، همودیالیز، مراکز مراقبت طولانی مدت و مصرف داروهای تزریقی در این بخش بررسی خواهد شد.

✓ مصرف آنتی بیوتیک: احتمالاً MRSA به دلیل انتخاب آنتی بیوتیک بوجود آمده است (۱۶, ۶۲). مصرف آنتی بیوتیک (خصوصاً سفالوسپورین و مصرف فلوروکینولون) به شدت با خطر کلنی سازی و عفونت MRSA ارتباط دارد (۲۱, ۶۴, ۱۰۱). در یک مطالعه مورد شاهدهی شامل ۱۹۸۱ مورد MRSA، خطر ابتلا به MRSA با تعداد داروهای ضد میکروبی افزایش یافت. نسبت شانس (OR) برای تشخیص MRSA در بیمارانی که ۱، ۲، ۳ یا بیشتر از ۴ داروی ضد میکروبی مصرف می کردند به ترتیب ۱.۵۷، ۲.۶۶ و ۶.۲۴ بود. بالاترین خطر برای فلوروکینولون ها (۳.۳۷) بود (۱۰۲).

✓ عفونت HIV: افراد آلوده به ویروس HIV در معرض خطر بیشتر برای عفونت MRSA هستند. در یک مطالعه مورد شاهدهی از عفونت MRSA در میان ۷۲۶ بیمار، HIV یک عامل خطر مهم برای عفونت بود (OR=۳/۳). شیوع عفونت MRSA بین ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ شش برابر شده است (۱۰۳).

✓ مصرف مواد مخدر تزریق: در یک گزارش خلاصه داده ها از شش سایت برنامه عفونت های نوظهور در ایالات متحده بین سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۶؛ مصرف کنندگان مواد مخدر تزریقی ۱۶ برابر بیشتر از افراد غیرتزریقی احتمال ابتلا به عفونت MRSA تهاجمی را داشتند. عفونت ها شامل باکتری می، اندوکاردیت و استئومیلیت است (۸۳). نسبت موارد MRSA تهاجمی که در بین مصرف کنندگان مواد مخدر تزریق رخ داده است، طی ۵ سال گذشته از ۴ به ۹ درصد افزایش یافته است (۴۴).

✓ وجود کاتر همودیالیز ساکن: بیماران مبتلا همودیالیز که از کاترهای طولانی مدت استفاده می کنند، در معرض خطر قابل توجهی برای عفونت های مرتبط با کاتر به دلیل MRSA و سایر عوامل بیماری زا قرار دارند. به عنوان مثال، در بررسی ۵۲۸۷ مورد عفونت تهاجمی MRSA در طول سال ۲۰۰۵، ۱۵ درصد موارد در بیماران دیالیز رخ داده بود. در حقیقت، شیوع عفونت MRSA تهاجمی در بیماران دیالیز ۱۰۰ برابر بیشتر از جمعیت عمومی بود (۱۹). با این حال بین سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۱۱، کاهش

قابل توجهی در میزان MRSA مهاجمی به دلیل استفاده از آنتی بیوتیک های قوی تر، رعایت بیشتر موارد بهداشتی و پیشگیری از انتقال عفونت در بیماران دیالیزی مشاهده شد (۱۰۴).

✓ **اقامت طولانی مدت در مراکز بیمارستانی:** HA-MRSA در بین ساکنان مراکز مراقبت طولانی مدت شایع است. به عنوان مثال، استافیلوکوکوس اورئوس در یک مطالعه مشاهده‌ای پنج ساله از یک مرکز پرستاری ۱۲۰ تختخوابی، حدود ۱۵ درصد از عفونت‌های اکتسابی را به خود اختصاص داد. تقریباً نیمی از آنها MRSA بودند. علاوه بر این، MRSA اغلب بین بیمارستان‌ها و مراکز مراقبت طولانی مدت منتقل می‌شوند و یک مدار مداوم از انتقال MRSA را در مناطقی که این ارگانیسم‌ها شیوع دارند، ایجاد می‌کنند (۱۰۵).

۲-۲-۴. علایم بالینی

رویکرد بالینی به استافیلوکوکوس اورئوس شامل تاریخ دقیق و معاینه جسمی، مشاوره در مورد بیماریهای عفونی و ارزیابی تشخیصی شامل اکوکاردیوگرافی و تصویربرداری اضافی در صورت نیاز است.

✓ **تاریخچه و معاینه جسمی:** تاریخچه دقیق و معاینه جسمی ضروری است. برای شرایطی که منبع باکتری نامشخص است، بیماران باید با توجه به درگاههای احتمالی ورود از جمله عفونت اخیر پوست یا بافت نرم و وجود دستگاه‌های پروتز داخلی (از جمله سوند داخل عروقی، وسایل ارتوپدی و دستگاههای قلبی) با دقت مورد سؤال قرار بگیرند. همچنین در مورد علائمی که ممکن است منعکس کننده عفونت متاستاتیک باشد، از بیماران سؤال شود که ممکن است در ۳۰ درصد موارد بروز کند.

اینها شامل درد استخوان یا مفاصل (به‌خصوص درد کمر، نشانگر استئومیلیت مهره، **سیستیت** و یا آبسه اپیدورال، تب طولانی و یا عرق (نشان دهنده اندوکاردیت)، درد شکم (خصوصاً درد ربع فوقانی چپ، که ممکن است منعکس کننده **انفارکتوس طحال**) باشد. معاینه جسمی باید شامل معاینه دقیق قلب برای علائم صداهای منظم جدید یا نارسایی قلبی باشد. برای اثبات اختلالات نورولوژیک کانونی باید ارزیابی عصبی انجام شود (۱۰۶).

✓ مشاوره در مورد بیماری‌های عفونی: مشاوره در مورد بیماری‌های عفونی در بستر یک مؤلفه مهم مدیریت برای بیماران مبتلا به استافیلوکوکوس اورئوس است و هر زمان ممکن باشد، باید انجام شود (۱۰۷-۱۰۹). در یک مطالعه گذشته نگر، با مقایسه مشاوره در کنار تختخواب با مشاوره تلفنی برای مدیریت ۳۴۲ بیمار مبتلا به استافیلوکوکوس اورئوس، مشاوره در کنار تختخواب با مرگ و میر ۹۰ روزه به طور قابل توجهی پایین تر (۹ در مقابل ۲۹ درصد؛ نسبت شانس ۰/۲۵) همراه بود (۱۰۷). چندین مطالعه دیگر نیز نشان داده اند که مشاوره در کنار بستر بیمار توسط یک متخصص بیماری‌های عفونی با نتایج بهتری شامل مرگ و میر کمتر، عود کمتر و میزان بستری پایین تر از مشاوره تلفنی همراه است (۱۰۷، ۱۰۹).

✓ ارزیابی تشخیصی: به طور کلی، کشت‌های خون مثبت برای استافیلوکوکوس اورئوس باید به عنوان یک یافته بالینی مهم مورد توجه قرار گیرند. تمام بیماران مبتلا به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برای ارزیابی وجود اندوکاردیت باید تحت اکوکاردیوگرافی قرار گیرند. تصویربرداری تشخیصی اضافی باید متناسب با یافته‌های مربوط به تاریخچه و معاینه جسمی باشد (۱۱۰).

✓ اکوکاردیوگرافی: کلیه بیماران مبتلا به آلودگی با استافیلوکوکوس اورئوس باید برای ارزیابی وجود اندوکاردیت تحت ارزیابی اکوکاردیوگرافی قرار بگیرند (۱۱۱، ۱۱۲). ابتدا باید TEE¹ انجام گیرد (۱۱۲). نتایج اکوکاردیوگرافی حتی وقتی مطالعه منفی باشد، مفید است. زیرا عدم وجود IE ممکن است بر تصمیمات مربوط به مدت زمان درمان ضد میکروبی تأثیر بگذارد. در یک مطالعه شامل ۱۰۳ بیمار مبتلا به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، تشخیص آندوکاردیت به ترتیب در ۷ و ۲۵ درصد موارد TTE و TEE تشخیص داده شد (۱۱۳).

✓ تصویربرداری: تصویربرداری باید متناسب با یافته‌های مربوط به تاریخچه و معاینه فیزیکی باشد. بیماران مبتلا به کمردرد باید از نظر استئومیلیت ارزیابی شوند. تصویربرداری از مهره (توموگرافی کامپیوتری) باید برای بیماران مبتلا به درد شکم یا حساسیت زاویه ای از زاویه دید انجام شود تا از نظر وجود انفارکتوس طحال، انفارکتوس کلیوی، آبسه پسواس^۲ یا سایر محل‌های عفونت داخل شکمی ارزیابی

¹ Transthoracic echocardiography

² Psoas abscess

شود. چنین تصویربرداری برای بیماران مبتلا به اندوکاردیت مستند حتی در صورت عدم وجود علائم کانونی برای ارزیابی محل های تحت بالینی عفونت متاستاتیک نیز مناسب است (۱۱۰).

۲-۲-۵. درمان استافیلوکوکوس اورئوس

درمان استافیلوکوکوس اورئوس شامل کنترل سریع منبع **آلودگی** (از جمله حذف کاتتر عروقی درگیر یا تخلیه و جراحی آبنه در صورت وجود) و درمان ضد میکروبی می باشد (۱۱۴). انتخاب داروهای ضد میکروبی به نتایج حساسیت جامعه بستگی دارد که در ادامه مورد بحث قرار می گیرد.

✓ **درمان تجربی:** میزان تاثیر گذاری درمان تجربی قبل از مشخص شدن میزان حساسیت جامعه نامشخص است. درمان ضد میکروبی تجربی راهی برای مقابله در برابر MRSA می باشد. درمان تجربی برای MRSA شامل ونکومايسين است (۱۵ تا ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم / دوز هر ۸ تا ۱۲ ساعت، بیش از ۲ گرم در هر دوز داپتومايسين ۶ تا ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم به صورت داخل وریدی یک بار در روز) یک داروی جایگزین قابل قبول است. پس از دستیابی به نتایج حساسیت، اگر ایزوله حساس به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس باشد، درمان آنتی بیوتیکی باید به یک عامل بتالاکتام (مانند نفسی سیلین ، اگزاسیلین یا سفازولین) تغییر یابد (۱۱۰).

✓ **استافیلوکوکوس حساس به متی سیلین:** درمان باکتری MSSA به طور کلی شامل یک ماده بتالاکتام مانند نافیسیلین، اگزاسیلین یا فلوکلوکساسیلین می باشند (۱۱۵). اگر ایزوله حساس به پنی سیلین باشد، پنی سیلین داروی مورد نظر برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس است (۱۱۶). با این حال، اکثر ایزوله ها مقاوم به پنی سیلین هستند (۳۰).

۲-۲-۶. تشخیص آزمایشگاهی

در اینجا هر دو روش فنوتیپی و مبتنی بر DNA برای تشخیص MRSA وجود دارد. روشهای سنتی آزمایشگاه میکروبیولوژی شامل میکرودايلوشن براث، صفحات غربالگری آگار حاوی نمک (۴٪) و اگزاسیلین (۶ میکروگرم بر میلی لیتر) و آزمایش انتشار دیسک سفوکسیتین می باشد (۲۶). آزمایش

انتشار دیسک سفوکسیتین از معتبرترین آزمایش‌ها است (۱۱۷). همچنین واکنش زنجیره ای پلیمراز^۱ (PCR)، روش دقیق برای تشخیص ایزوله‌های MRSA با شناسایی ژن *mecA* می‌باشد (۲۷).

تست‌های غربالگری بیشتر از نواحی بدن (عمدتاً نواحی قدامی) که اغلب حامل باکتری هستند، انجام می‌شود. بیشتر بیماران مبتلا بدون علامت با غربالگری (حساسیت ۷۳ تا ۹۳ درصد) از همین ناحیه تشخیص داده می‌شوند (۱۱۸، ۱۱۹). نتایج روش‌های سنتی استفاده شده برای پردازش تست‌های تشخیصی ۴۸ تا ۷۲ ساعت طول می‌کشد. در حالی که تکنیک‌های جدیدتر، زمان کمتری برای تشخیص MRSA لازم دارند. انواع مختلفی از آگارهای کروموزنیک موجود است که می‌توانند لکه‌های MRSA را در ۲۴ ساعت تشخیص دهند. یکی از این آگارهای انتخابی کروموزنیک حاوی سفوکسیتین است و اکثر ایزوله‌های MRSA را طی ۲۴ ساعت شناسایی می‌کند، در حالی که این زمان برای آزمایش‌های PCR برای *mecA* می‌تواند MRSA را طی دو ساعت تشخیص دهد (۲۹).

۲-۲-۷. مکانیسم مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس

❖ ژن *mec*

حضور ژن *mec* لازمه مقاومت به متی‌سیلین است. این ژن در تمامی سویه‌های مقاوم وجود دارد، اما در سویه‌های حساس حضور ندارد (۱۲۰). مؤلفه ساختاری ژن *mecA*، پروتئین اتصال پنی‌سیلین ۲a (PBP2a) را که مقاومت به متی‌سیلین و سایر بتالاکتام‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز را ایجاد می‌کند، کدگذاری می‌کند. ژنوم کامل انواع بیشماری از سویه‌های MRSA منتشر شده است، در این بین چندین طبقه از جزایر بیماری‌زایی شناسایی گردیده است (۱۲۱).

ژن *mec* شامل یک مؤلفه ساختاری، *mecA* و در بسیاری موارد، دو مؤلفه نظارتی است که بیان ژن را کنترل می‌کند:

^۱ . Polymerase chain reaction

mecR1-mecI یک تنظیم کننده منفی رونویسی *mecA* است. جهش در این مجموعه از ژنها منجر به سویه‌های بسیار مقاوم‌تر می‌شود.

ژن های بتالاکتاماز *blaI*, *blaRI*, *blaZ* / *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل شباهت توالی به ژن **mecR1-mecI** می‌توانند رونویسی ژن *mecA* را بر عهده بگیرند (۱۲۲). با این حال بتالاکتامازی که مقاومت در برابر مکانیسم متفاوت از *mec* ایجاد می‌کند، حلقه بتالاکتام را هیدرولیز می‌کند. از آنجایی که این تنظیم منفی خیلی کنترل نمی‌شود، بیان مقاومت در اثر قرار گرفتن در معرض بتالاکتام‌ها نسبتاً سریع است. کنترل سست و غیر دقیق به ژن *mec* اجازه می‌دهد تا پروتئین با تمایل کمتر به سویسترا را تولید کند و موجب مقاومت به متی‌سیلین گردد.

❖ پروتئین متصل شونده پنی‌سیلین^۱

پروتئین‌های اتصال دهنده پنی‌سیلین آنزیم‌های پپتیداز واقع در غشای باکتریایی هستند که واکنش‌های ترشح پپتیدوگلیکان را در طول سنتز دیواره سلولی کاتالیز می‌کنند. *mecA* کد کننده پروتئین پنی‌سیلین (PBP) **2a**، پروتئین القایی است که مقاومت در برابر بتالاکتام‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز نیمه سنتزی را ایجاد می‌کند که شامل متی‌سیلین، نافسیلین، اگزاسیلین و همه سفالوسپورین‌ها می‌باشد (۱۲۳، ۱۲۴). در این بین در مقایسه با چهار PBPs دیگر، **PBP2a** میل کمتری برای ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام دارد. در سویه‌های *استافیلوکوکوس حساس*، بتالاکتام‌ها به صورت کووالانسی به **PBPs 1-3** متصل می‌شوند و بدین ترتیب فعالیت آنزیم را غیرفعال می‌کنند، از ترشح جلوگیری و در نهایت در مرگ باکتریها کمک می‌کنند. **PBP2a** با میل کم به بتالاکتام‌ها، می‌تواند فعالیت آنزیمی این **PBP** ها را جایگزین کرده و امکان تکمیل موتناژ دیواره سلولی را فراهم کند. پپتیدوگلیکان حاصل دارای یک ترکیب ساختاری متفاوت از موروپپتید است، تغییری که به نظر نمی‌رسد عملکرد سلول را تحت تأثیر قرار دهد (۱۲۵).

¹. Penicillin-binding protein 2a

❖ کاست کروموزومی استافیلوکوکی استافیلوکوکوس اورئوس

کاست SCCmec یک عنصر ژنتیکی متحرک است که حاوی ژن *mec* است و در گونه‌های استافیلوکوک یافت می‌شود. حداقل دوازده نوع کروموزوم کاست استافیلوکوکی (SCCmec) وجود دارد که تاکنون شناسایی شده‌اند. ژن *mec* بخشی از عنصر کروموزومی ۲۱ تا ۶۷ کیلوبایت با نام SCCmec است. اکثر کلون‌های MRSA مربوط به مراقبت‌های بهداشتی (عمدتاً بیمارستانی) با انواع SCCmec I، II و III همراه هستند و مقاوم به چند دارو هستند. در مقابل، بیشتر سویه‌های MRSA مرتبط با جامعه (CA-MRSA) دارای نوع IV یا V SCCmec هستند و قبلاً مستعد سایر خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی بودند، هر چند که دیگر اینگونه نیست (۲۴، ۱۲۱).

مقاومت به متی‌سیلین ممکن است با مداخله در سنجش *agr quorum* باعث کاهش حدت MRSA مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی شود (۱۲۶). در یک مطالعه، سویه‌های MRSA مربوط به مراقبت‌های بهداشتی حامل SCCmec نوع II میزان سموم سیتولیتیک کاهش یافته است که توسط یک آزمایش بقا سلول T در شرایط آزمایشگاهی و مدل باکتری موش در داخل بدن اندازه‌گیری شده است. به نظر می‌رسد تغییر دیواره سلولی روی سیستم سنجش *agr quorum* تأثیر می‌گذارد، و در نتیجه حدت کاهش می‌یابد. این اثر در بین جدا شده‌های CA-MRSA مشاهده نشده است و ممکن است به توضیح عدم موفقیت MRSA به دست آمده در بیمارستان در انتشار آن در جامعه، کمک کند.

همانطور که اشاره شد، توالی SCCmec از بسیاری از سویه MRSA منجر به شناسایی انواع مختلف SCCmec (I-XII) می‌شود که در آرایش و اندازه ژنتیکی متفاوت است (۲۵، ۱۲۷). انتقال SCCmec از MRSA به سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین در چندین نوبت اتفاق افتاده است، و در نتیجه ایزوله‌های جدید MRSA که به سرعت در مراکز مراقبت‌های بهداشتی گسترش یافته‌اند. از آنجایی که این انتقال رایج نمی‌باشد محدود به تعداد کمی از گونه‌های استافیلوکوکوس می‌باشد. در سال ۲۰۱۱، یک نوع جدید (*mecA* homologue *mecC*) (SCCmec) در type II در ایزوله‌های جدا شده‌های به دست آمده از گاوها و انسان‌ها شناسایی شد (۱۲۸). در این مقاله (و همچنین سایرین) دام‌ها را به عنوان مخزنی از MRSA با پتانسیل انتقال به انسان مشخص کرد (۱۲۹).

سویه های HA-MRSA تمایل به مقاومت در برابر چند دارو و حمل کروموزوم کاست استافیلوکوکی (SCCmec) نوع II دارند (۳۱). آنها با استفاده از الگوی الکتروفورز میدان پالس USA100 یا USA200 (PFGE) تایپ می شوند (۱۳۰).

بیشتر سویه های CA-MRSA غالباً دارای SCCmec نوع IV یا V هستند و غالباً ژنهایی را برای سیتوتوکسین Panton-Valentine leukocidin حمل می کنند که باعث افزایش حدت می شود (۷۳, ۱۲۱, ۱۲۷, ۱۳۱-۱۳۳). بیشتر CA-MRSA با الگوی الکتروفورز میدان پالس USA300 یا USA400 تایپ می شوند.

۸-۲-۲ جزایر بیماریزایی

جزایر بیماریزایی استافیلوکوکی، المنتهای ژنتیکی با ۱۵ تا ۲۰ کیلوباز (kb) هستند که در مکانهای ثابتی از کروموزوم قرار گرفته اند و حامل ژنهایی برای توکسین های سوپرانتی ژن می باشند. هفت جزیره بیماریزایی (vSa) در استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده است، که حضور یا فقدان این جزایر پتانسیل بیماریزایی باکتری را تعیین می کند. جزایر بیماریزایی حامل جزایر ژنومی از خانواده vSA می باشند که حدود نیمی از توکسینها و فاکتورهای بیماریزایی استافیلوکوکی را کد می کنند. این جزایر ژنومی عمدتاً مسئول بیماریزایی گونه ها هستند. جزایر ژنومی شامل vSA1 و vSA2 می باشد. vSA1 حامل ژنهای استافیلوکوکوس اورئوس است و vSA2 حامل ژنهای استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. این ژن ها کدکننده انترتوکسین ها و توکسین سندرم شوک سمی استافیلوکوکی هستند (۱۳۷).

۹-۲-۲ شاخص های بیماریزایی

استافیلوکوکوس اورئوس طیف متنوعی از فاکتورهای بیماریزایی را کد می کند. این فاکتورها شامل اجزای ساختاری و پروتئین هایی است که در بیماریزایی و عفونتهای استافیلوکوکی دخیل هستند. دو مکانیسم اصلی که در بیماریزایی باکتری نقش دارند شامل: حمله به سلول میزبان و برانگیختن پاسخ التهابی است. اتفاقاتی که در این مرحله رخ می دهد شامل کلونیزاسیون و سنتز مولکول های خارج سلولی است که اتصال را تسهیل می کنند و سبب تحریک پاسخ های التهابی می شوند. مکانیسم دوم

شامل تولید توکسین‌های مختلف است. آگروتوکسین‌های تولید شده در این مرحله سبب آسیب بافتی بیشتری در میزبان می‌شوند که منجر به گسترش عفونت در بدن خواهد گردید (۱۳۸).

۲-۲-۱۰. بیوفیلیم

بیوفیلیم به اجتماعات بهم متصل میکروبی گفته می‌شود که توسط یک ماتریکس متشکل از مواد خارج سلولی احاطه شده‌اند و با توجه به رشد، بیان ژن و سنتز پروتئین فنوتیپ تغییر یافته‌ای را از خود نشان می‌دهند. ضخامت بیوفیلیم می‌تواند از یک لایه نازک سلولی تا اجتماع قابل توجه میکربی در یک لایه چسبناک متغیر باشد. استافیلوکوکوس اورئوس استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند بیوفیلیم چند لایه ای از گلیکوکالیکس یا اسلایم لایر بسازد. مطالعات نشان داده است که ۸۰٪ گلیکوکالیکس را تیکوئیک اسید و پروتئین‌های استافیلوکوکوس اورئوس تشکیل می‌دهند. همچنین یک آنتی ژن پلی ساکاریدی اختصاصی که پلی ساکارید اینترسلولار آنتی ژن (PIA)^۱ نام دارد در ساختار بیوفیلیم وجود دارد (۱۳۹). PIA محصول لوکوس ژنی^۲ استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. ژنهای این لوکوس شامل ژنهای تنظیمی (استافیلوکوکوس اورئوس) و بیوسنتتیک (استافیلوکوکوس اورئوس) می‌باشند که برای تشکیل بیوفیلیم و بیماری‌زایی ضروری بوده و در شرایط بیهوازی شبیه آنچه که در محیط بیوفیلیم وجود دارد تنظیم مثبت^۳ می‌شوند. بیماری‌هایی که بواسطه تولید بیوفیلیم ایجاد می‌گردند شامل استئومیلیت، عفونت وسایل مصنوعی، پریدندیت، عفونت مزمن زخم، رینوسینوزیت مزمن، اندوکاردیت، عفونت چشم و عفونت‌های چند میکروبی می‌باشند (۱۳۸).

۲-۲-۱۱. Staphylococcal protein A

پروتئین A جزئی از فاکتورهای ویرولانسی بسیار مهم استافیلوکوکوس اورئوس در بیماری‌زایی محسوب می‌شود و نقش بسیار مهمی در پاتوژنز این باکتری دارد. با اتصال این ناحیه به قسمت FC از آنتی بادی عملکرد خود را انجام می‌دهد و باکتری را از اپسونیزاسیون حفظ می‌کند. این فاکتور دارای ساختار پروتئینی بوده و از ۵۰۸ اسید آمینه ساخته شده وزن تقریبی ۴۲ KD است که در پپتیدوگلیکان باکتری جای می‌گیرد و وظیفه اتصال به ناحیه FC از آنتی بادی‌ها را دارد. پروتئین A دارای ۲۱۵۰ BP

^۱ Polysaccharide intercellular antigen

^۲ Intercellular adhesion

^۳ Upregulate

نوکلوتید است و یک ناحیه دارای تغییرات بالا تحت عنوان X REGION که در واقع یک دنباله کوتاه تکرار شونده^۱ است را دارد که همان FC binding region بوده و در انتهای C-terminus از protein A قرار می‌گیرد، باعث اتصال آن به دیواره پپتیدو گلیکان می‌شود دارای ۱۲ تا ۸ تایی از توالی‌های تکراری یا تقریباً ۱۶۰ BP و با وزن تقریبی ۱۵ KD می‌باشد که در یک protein A نسبت به دیگری متفاوت می‌باشد که از همین تفاوت در جهت نوع خاصی از تایپینگ استافیلوکوکوس اورئوس به نام spa typing مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۴).

۲-۲-۱۲. انواع روش‌های تایپینگ استافیلوکوکوس اورئوس

تکنیک‌های تایپینگ متعددی برای استافیلوکوکوس اورئوس معرفی شده است که اهمیت زیادی برای اپیدمیولوژیست‌ها و پزشکان دارد. یکی از مهمترین معضلاتی که در آزمایشگاه‌ها وجود دارد، آنالیز دقیق و قابل اطمینان جهت گروه بندی سویه‌های مرتبط و غیر مرتبط این باکتری می‌باشد. معمولاً روش‌های تایپینگ برای بررسی شیوع عفونتهای بیمارستانی، پیگیری درمان بیماران و ایجاد یافتن عفونت‌های مزمن می‌باشد. تایپینگ‌ها باید معیارهای قابل قبولی داشته باشند از جمله این معیارها تکرارپذیری، قدرت تمایز بالا، میزان تطابق با سایر تکنیک‌های تایپینگ، سرعت و تفسیر آسان نتایج است (۱۴۰).

spa تایپینگ

ژن استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل متمایز کننده است که دارای ناحیه پلی مورفیسم X با توالی کوتاه می‌باشد. همچنین در مطالعات مختلف الگوهای متنوعی از این ژن شناسایی شده است. این ژن کدکننده پروتئین A که از پروتئین‌های سطحی استافیلوکوکوس اورئوس است، می‌باشد. این پروتئین علاوه بر اینکه عامل ویرالانس باکتری محسوب می‌گردد، جهت تعیین هویت اختصاصی باکتری نیز به کار می‌رود. تایپینگ spa ایزوله‌ها روش مناسبی برای اهداف اپیدمیولوژیک به حساب می‌آید (۱۴۱). این روش تایپینگ در مقایسه با روش تایپینگ قدیمی استافیلوکوکوس اورئوس که فازتایپینگ است، قدرت تمایز و حساسیت بسیار بهتری دارد. همچنین این روش تایپینگ می‌تواند هم میزان شیوع دو استرین از استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان‌ها و ارتباط آنها را نسبت به هم نشان دهد، و هم در تشخیص

^۱ . short sequence repeat

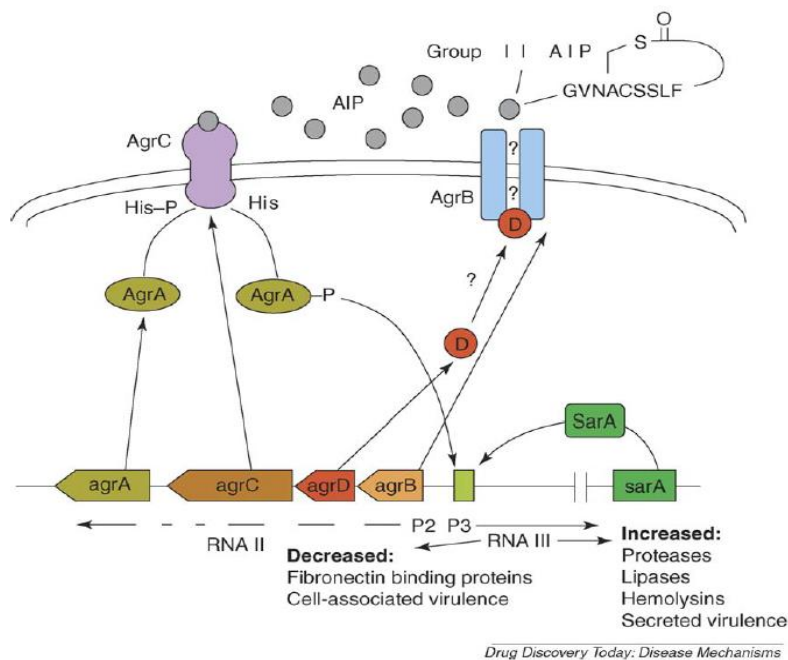
کلون‌های باکتری و همچنین منابع اپیدمیک عفونت بسیار کمک کننده باشد. روش *spa typing* در واقع آنالیز (VNTR) می‌باشد که تفاوتی از ژن *Spa* را که در اثر موتاسیون نقطه‌ای که به دنبال خطای DNA پلی‌مراز منجر به حذف یا افزوده شدن یک تکرار می‌شود را به خوبی نشان می‌دهد و روش مناسب برای بررسی شیوع عمومی یا موضعی *استافیلوکوکوس اورئوس* در یک منطقه می‌باشد. اساس روش مذکور آنالیز توالی *single target locus* است که یک روش ارزان قیمت بوده و به راحتی در دسترس می‌باشد و اطلاعات بسیار قوی در مورد تعیین روابط اپیدمیولوژیک و فیلوژنیک به ما می‌دهد (۳۴, ۳۵).

Agr regulatory

لکوس *Agr* نقش مهمی در کنترل بیان فاکتورهای ویروالانس *استافیلوکوکوس اورئوس* ایفا می‌کند. لکوس *Agr* حاوی دو نسخه رونویسی مختلف *RNAII* و *RNAIII* است که توسط پروموتورهای *P2* و *P3* کنترل می‌شوند. اپرون *P2* دارای چهار ژن *AgrA*، *AgrB*، *AgrC* و *AgrD* می‌باشد. *AgrB* و *AgrD* پیش ساز پپتید خودالقایی (AIP) بوده و *AgrA* و *AgrC* به ترتیب حسگر غشایی و تنظیم کننده پاسخ هستند. در شرایطی که تراکم باکتری بالا باشد، AIP افزایش یافته و با برهمکنش با *AgrC* موجب فعال شدن *AgrA* می‌گردد. *AgrA* یک پروتئین اتصال به DNA است که قادر است پروموتورهای *P2* و *P3* را فعال نماید. وجود چهار گروه تخصصی (*Agr IV, III, II, I*) در *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل پلی مورفیسم در توالی اسیدهای آمینه (*AgrD*) و گیرنده مرتبط با آن (*AgrC*) می‌باشد. گروه‌های اختصاصی *Agr* با عفونت ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* مرتبط هستند، به طوری که استرین‌های حاوی *AgrIV* با سندرم اکسفولیاتیو ژنرالیزه، استرین‌های حاوی *AgrIII* با تولید توکسین TSST-1 مرتبط هستند. همچنین سویه‌های ایجاد کننده اندوکاردیت عمدتاً دارای گروه‌های *AgrI* و *AgrII* و سویه‌های حاوی گروه‌های *AgrI* عمدتاً در ارتباط با بیماریهای تهاجمی به ویژه باکتری می‌باشند (۳۸, ۳۹).

¹. variable number of tandem repeats

ژن تعدیل کننده جانبی (*Agr*) / استافیلوکوکوس اورئوس شامل یک سری ژن‌هایی می‌شود، که باعث ایجاد تولید یک مکانیسم منظم که در یک روش وابسته به رشد انجام می‌گردد، می‌شود. زمانی باکتری به تراکم بحرانی برسد، یک چرخه پیتیدی خوالقایی^۱ (*AIP*) که مشتق شده از *AgrD* که از طریق *AgrB* ترشح می‌شود، به یک گیرنده سطحی هیستیدین کیناز^۲، *AgrB*، و در نتیجه فسفوریلاسیون^۳ *AgrA* متصل می‌گردد. *AgrA* وظیفه رونویسی از *RNAIII* بر عهده دارد. همانطور که دانمن و همکاران نشان دادند، مولکول *RNAIII* وظیفه رونویسی از بسیاری از ژن‌های پایین دست و بالا دست را بر عهده دارد. در عکس شماره ۲ طبقه و وظایف ژن‌های *Agr* مشخص شده است.



شکل ۱-۱ وظایف و عملکرد ژن‌های *Agr*

بر طبق شکل، به طور خلاصه *AgrD*، *AIP* پردازش شده را کد می‌کند و از طریق *AgrB* به فضای خارج سلولی منتقل می‌گردد. زمانی که غلظت باکتری به تراکم بحرانی برسد، *AIP* به گیرنده هیستیدین کیناز، *AgrC* متصل و به دنبال آن، فسفوریلاز و متعاقب آن *AgrA* فعال می‌گردد. فسفریله شدن

¹ . cyclic autoinducing peptide

² . histidine kinase

³ . phosphorylation

AgrA رونویسی RNAlII در پروموتور P3 را فعال می‌کند. RNAlII به عنوان یک فاکتور رونویسی در بیان ژن‌هایی که فاکتورهای بیماریزا را ترشح می‌کنند و تنظیم کمتری انجام می‌دهد، عمل می‌کند.

چند شکلی بودن ژنهای *agr* استافیلوکوکوس اورئوس باث ایجاد چهار نوع پروتئین Agr گردیده است، هرچند امروزه شکل جدید از این ژن باعث شده که آن را به چهار گروه (*agr* I-IV) طبقه‌بندی می‌کنند.

AIP های گروه های مشابه Agr در تولید RNAlII کمک می‌کند، در حالی که در گروه های متفاوت با دارنده است. در جدول شماره ۱ ژنوتیپ های رایج مختلف *agr* در استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین در مطالعه‌ای در آمریکا آمده است.

جدول ۱-۱ ژنوتیپ های رایج مختلف *agr* در استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین.

Table 1. <i>agr</i> genotypes of common USA MRSA				
PFT	SCCmec	MLST	<i>agr</i>	Comments
USA100	II	5	II	Predominant nosocomial MRSA, GISA, VRSA
USA300	IV	8	I	Community-associated, PVL+
USA400	IV	1	III	Community-associated, PVL+
USA500	IV	8	I	
USA600	IV	45	I	
USA800	IV	5	II	

dru typing

اخیراً درون ناحیه کاست کروموزومی ژن *mec* نیز یک تکرار ۴۰ جفت بازی پشت سر هم با بازهای متغیر یا واحد تکراری مستقیم ۱ (*Dru*) شناسایی شده است که به علت توانایی بالا در تمایز دادن کلون های EMRSA-15 و EMRSA-16 دو ایزوله ای که توسط سایر روش ها قابل تمایز نیستند، مورد توجه قرار گرفته است. در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، واحد تکراری مستقیم (*dru*) در مجاورت مناطق IS431 در ناحیه SCCmec در تجزیه و تحلیل اپیدمیولوژیک سویه های اپیدمی بسیار یکسان و در ردیابی افقی حرکت SCCmec مفید می باشد. استفاده موثر از روش تایپینگ *dru* توسط یک سیستم یکسان نامگذاری تسهیل شده است. یکی از مزیت های مهم این روش تایپینگ این است که داده های جدید تولید شده را می توان در یک پایگاه داده مشترک بین المللی فهرست بندی و مقایسه نمود (۳۶، ۳۷).

تعداد کپی های استافیلوکوکوس اورئوس به این صورت است که هر ۱۸ تکرار معادل 40 جفت باز است. اندازه هر طرفین منطقه ۵۱۷ جفت باز و توالی آغازگر برای تکثیر *dru* شامل:

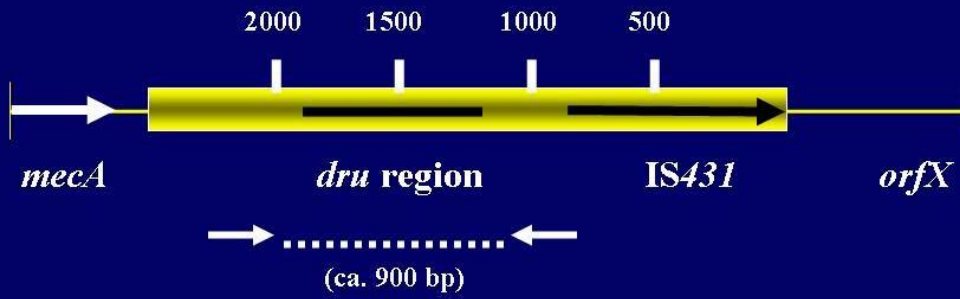
5'-GTTAGCATATTACCTCTCCTTGC-3'

5'-GCCGATTGTGCTTGATGAG-3'

می باشد (۱۴۲). پسوند *d* برای (*dru repeat*) همراه با اعداد برای شناسایی تکرارهای خاص استفاده می شود. در حالی که پیشوند *dt* (*dru type*)، همراه با اعداد برای شناسایی ترکیب های تکراری خاص مورد استفاده قرار می گیرند. این توالی ها به صورت ترکیب یک حروف الفبا و عدد برای نشان دادن مکانهای مختلف تغییر استفاده گردیده است. برای مثال *dr2a* و *dr2b* هر دو به صورت مشترک در دو شباهت دارند، اما در نوکلئوتید در موقیعت های متفاوتی قرار دارند. همچنین در مورد تکرار های خاص با یک الفبای اضافی مانند *dt8a* نشان داده می شود (۳۶).

¹ . Direct Repeat Unit

***mec*-associated
direct repeat unit (*dru*) region
40 bp VNTR**



شکل ۲-۱. نمای شماتیک از *dru* VNTR بر روی ژن *mecA*

۲-۳. پیشینه در داخل کشور

✓ صداقت و همکاران در سال ۱۳۹۷، مطالعه با هدف تعیین خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی گونه‌های *S. aureus* جدا شده از بیماران و کارمندان مراقبت‌های سلامت از بیمارستان آموزشی اصفهان، ایران انجام دادند. این مطالعه مقطعی روی ۲۶۲ سواب بینی و ۲۳ ایزوله بالینی، جمع آوری شده از بیمارستان از بهمن ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ۱۳۹۵ انجام شد. کاست کروموزومی استافیلوکوکی (SCCmec) و تایپ کردن توالی (MLST) *multilocus* برای ایزوله‌های انتخاب شده، انجام گردید. به طور کلی، ۲۳٪ و ۱۸٪ کارکنان مراقبت‌های سلامت و بیماران به ترتیب ناقل بودند. میزان (MRSA) در کارمندان مراقبت‌های بهداشتی بینی، بیماران بینی و نمونه های بالینی به ترتیب ۱۳٪، ۳۳٪ و ۵۲٪ بود. تایپ مولکولی ایزوله‌های MRSA نشان داد که شایع‌ترین SCCmec نوع III است. نتایج این مطالعه نشان داد که کلونهای ST مرتبط با MRSA مرتبط با مراقبت‌های سلامت (HA-MRSA) فعالانه در محیط بیمارستان‌ها در گردش است، بنابراین سیاست‌های کنترل عفونت در مراقبت‌های بهداشتی الزامی است (۱۴۳).

✓ عبادی و خلیلی آزاد در سال ۱۳۹۷، به ردیابی ژن مقاومت به متی‌سیلین و بررسی ژنوتیپی کاست کروموزومی SCC/استافیلوکوکوس/اورئوس در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بینی کارکنان و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری پرداختند. در این مطالعه مقطعی -توصیفی ۲۳۲ نمونه سواب بینی از کارکنان بیمارستان‌های لارستان در سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری گردید. شناسایی ایزوله‌های استافیلوکوکوس/اورئوس با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی انجام شد. در تمامی ایزوله‌ها، سنجش الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک، حداقل غلظت بازدارندگی با روش E-test و حساسیت به متی‌سیلین با روش آگار اسکرین انجام شد. همچنین حضور ژن مقاومت آنتی‌بیوتیک *mecA* و تایپینگ SCCmec با روش multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی ۳۷ مورد آلوده به باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس بودند. از بین ایزوله‌ها، ۲۸ سویه (۷۵٪) دارای ژن مقاوم به متی‌سیلین بودند. از این بین ۲۱ سویه اکتسابی از جامعه و ۷ مورد از مراکز بهداشتی درمانی بود. همچنین نتایج تایپینگ سویه‌های SCC نشان داد که تایپ I

با فراوانی ۳۲ درصد و به دنبال آن تایپ IV با فراوانی ۲۸ درصد به ترتیب فراوان‌ترین ایزوله‌ها بودند. نتایج نشان داد که میزان شیوع باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بیش از ۳۲ درصد است و بیشتر این ایزوله‌ها کسب شده از جامعه بودند. این امر می‌تواند هشدار جدی در مورد ضرورت درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری و کنترل افراد ناقل در محیط بیمارستان را مطرح نماید (۱۴۴).

✓ عبیری و همکاران در سال ۱۳۹۷، مطالعه‌ای مقطعی با هدف شناسایی ژن‌های کدکننده مقاومت و خصوصیات مولکولی سویه‌های MRSA جداشده از بیماران بستری در بیمارستان انجام دادند. این مطالعه که در طول ۱۰ ماه انجام گرفت، تعداد ۱۱۲ سویه MRSA جداشده از بیماران بستری در بیمارستان بررسی شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به روش دیسک‌دیفیوژن و میکروبراث دایلوژن بررسی شد. تکنیک PCR برای شناسایی ژن‌های کدکننده مقاومت انجام شد. تایپینگ SCCmec با روش multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. محققان در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که، یک نوع تنوع ژنتیکی در بین سویه‌های در حال چرخش در بیمارستان‌های مورد مطالعه بود که نیاز برای اجرای سیاست کنترل عفونت مناسب برای کاهش انتشار تایپ‌های MRSA مقاوم به چند دارو تاکید می‌کند (۱۴۱).

✓ در مطالعه‌ای که توسط فصیحی و همکاران در سال ۱۳۹۶ دو روش تایپینگ مولکولی شامل تعیین توالی PCR معمولی و تجزیه و تحلیل ذوب بالا (HRM) برای پروتئین A استافیلوکوکوسی ۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج روش PCR، ۱۶ نوع spa مختلف در بین ۳۰ ایزوله MRSA مشخص شد. در میان ۱۶ نوع spa مختلف، ۱۴ نوع spa با روش HRM از هم جدا گردید. دو نوع spa از جمله t4718 و t2894 از یکدیگر جدا نشدند. طبق نتایج این مطالعه، تایپ spa بر اساس روش آنالیز HRM بسیار سریع، آسان و با صرفه است، اما باید این روش برای مناطق مختلف و انواع تایپ‌های spa استاندارد شود (۱۴۵).

✓ محمودی و همکاران در سال ۱۳۹۶، مطالعه‌ای با هدف تعیین فراوانی ناقلین بینی، الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژنوتیپ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از پرسنل بیمارستان شهید بهشتی در شهر یاسوج (ایران) با استفاده از روش تایپینگ agr انجام دادند. در این مطالعه مقطعی، ۳۴۷ نمونه

گرفته شده از بینی به منظور شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس از کارکنان بهداشت و درمان بیمارستان شهید بهشتی جمع آوری شد. از دیسک های سفوکسیتین و شناسایی ژن *mecA* برای شناسایی ایزوله های مقاوم به متی سیلین استفاده شد. الگوهای حساسیت ضد میکروبی ایزوله ها در برابر ۱۵ آنتی بیوتیک مختلف با استفاده از روش دیسک از انتشار مورد آزمایش قرار گرفت. از روش Multiplex-PCR برای تایپینگ *agr* ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. نود و سه درصد از پرسنل ناقل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی خود بودند. از بین آنها ۹ نفر مقاوم به متی-سیلین بودند. از بین گروه های *agr*، *agr*I (۴۰/۹٪) و *agr*III (۴۰/۹٪) بودند. همه ایزوله ها (۱۰۰٪) نسبت به پنی سیلین مقاوم بودند (۱۴۶).

۲-۴. پیشینه در خارج از ایران

✓ خان^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۴، به بررسی گروه های خاص از *agr* در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و ارتباط آن با مقاومت آنتی بیوتیکی انجام شد. در مجموع ۹۰ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از دو بیمارستان مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله ها با آزمون های استاندارد بیوشیمیایی شناسایی شدند. مقاومت به متی سیلین با مقاومت اگزا سیلین و سفوکسیتین تأیید شد. از PCR چندگانه برای تعیین گروه های *agr* استفاده شد. شیوع MRSA، ۵۳ درصد بود. توزیع گروه های *agr* در MRSA به شرح زیر بود: ۲۲ (۴۵.۸٪) متعلق به گروه I بودند، ۱۴ نفر (۲۹/۱٪) متعلق به گروه III و ۲ (۴.۱٪) متعلق به گروه II بود. AgrIV در MRSA مشاهده نشد. برای ۱۷ ایزوله، گروه *agr* تشخیص داده نشده است. ایزوله های دارای *agr* III مقاومت آنتی بیوتیکی بالاتری نسبت به ایزوله های دارای *agr*I نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که برای کنترل مشکل MRSA باید سیاست کنترل دقیق عفونت و دستورالعمل های آنتی بیوتیکی اتخاذ شود. شیوع بیشتر *agr* I و *agr* III نشان می دهد که آنها گروه های غالب منطقه هستند (۱۴۷).

✓ در مطالعه ای که هو^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۶، با هدف بررسی تنوع بالینی و خصوصیات مولکولی عفونت MRSA در شنزن، در نه بیمارستان در چین انجام دادند. در مجموع، ۸۱۲ ایزوله MRSA

1. Khan

2. L.HU

جمع‌آوری و ۱۸۳ نمونه از آنها برای مطالعه بیشتر انتخاب شدند. بیماران مبتلا به عفونت HA-MRSA در مقایسه با سایر گروهها به طور کلی سن بیشتری داشتند. محل درگیری در بدن مشخص و ارائه‌های بالینی در بیماران آلوده مشهود بود، به عنوان مثال CA-MRSA (پوست و بافت نرم، ۵۳٪)، HA-MRSA (مجاری تنفسی، ۲۲٪؛ محل جراحی، ۲۰٪؛ زخمهای تروما، ۲۰٪) و HACO-MRSA (ماستیت، ۴۷٪). برخلاف HA-MRSA، دسته‌های دیگر از گونه‌ها به طور قابل توجهی بیشتر حساس به جنتامایسین، سولفامتوکسازول/تریمتوپریم و تتراسایکلین بودند. هیچ گونه مقاومت در برابر ونکومایسین یا لایزولید ثبت نشده است (۱۴۸).

✓ رودریگز^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۵، مطالعه‌ای با هدف مقایسه ۵ روش تایپ که برای شناسایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس استفاده می‌گردد، انجام دادند. کودکانی که در بیمارستان‌های کودکان سنت لوئیس و میسوری، با عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس مرتبط با جامعه بستری شده بودند، وارد مطالعه شدند. تکرار مبتنی بر توالی PCR (repPCR)، الکتروفورز ژل پالسفیلد (PFGE)، تایپینگ MLST، پروتئین استافیلوکوکی A و کاست کروموزوم استافیلوکوکی روی ۲۰۰ ایزوله از استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد. شاخص هر روش با استفاده از فرمول استاندارد برای این متریک محاسبه شده است، جایی که مقدار یک نشان از اختلاف بیشتر است و مقدار صفر کمترین مقدار است. به طور کلی در این مطالعه ۶۸ سویه مجزا توسط repPCR، ۱۷ سویه توسط PFGE، ۳۰ سویه توسط MLST، ۲۶ سویه توسط spa و پنج سویه توسط SCCmec typing شناسایی گردید. شاخص تمایز در repPCR بیشترین (۰/۸۸) و در SCCmec تایپینگ کمترین (۰/۶۰) بود (۱۴۹).

✓ هو^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۳، به بررسی تایپ‌های دقیق ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از روش dru تایپینگ پرداختند. در مجموع ۱۵۷ ایزوله MRSA از چهار منطقه مختلف در تایوان با پنج روش مولکولی مختلف، از جمله روش های SCCmec، MLST، spa، dru و SIRU تایپینگ مورد بررسی قرار گرفتند. چهار نوع SCCmec، هشت نوع MLST، ۱۵ نوع spa، ۱۱ نوع dru و ۳۱ SIRU وجود داشت. بیشترین تایپ تعیین شده توسط هر روش تایپینگ مولکولی SCCmec (۱۱۵ ایزوله، ۷۳٪)، ST239 (۹۹ ایزوله، ۶۳٪)، t037 (۱۰۷ ایزوله، ۶۸ درصد)، ۱۴ dru

1. Rodriguez

2. Cheng-MaoHo

copies (۷۶ ایزوله، ۰.۴۸٪)، SIRU profile 3013722 (۱۰۲ ایزوله، ۰.۶۵٪) بود. در این مطالعه محققان به این نتیجه رسیدند که روش‌های تایپینگ *dru* و *SIRU* قدرت تمایز بهتری نسبت به سایر روش‌ها داشتند (۱۴۲).

✓ گورینگ^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۸، سودمندی روش تایپینگ *dru* به عنوان یک رویکرد حساس تر برای ردیابی پایداری و گسترش گونه‌های "کلونال" EMRSA در اسکاتلند را بررسی کردند. تجزیه و تحلیل ۴۷ ایزوله EMRSA-15 و EMRSA-16 به دست آمده از ۲۲ آزمایشگاه بیمارستانی در طی یک دوره ۸ ساله (۱۹۹۷-۲۰۰۵) به ترتیب ۱۳ و ۱۲ نوع مختلف *dru* را نشان داد. نتایج این مطالعه نشان داد که تایپ کردن *dru* های مرتبط با *mec* ممکن است پتانسیل شناسایی و ردیابی زیرگروه‌های خاص اپیدمی MRSA غیرقابل تشخیص را داشته باشد (۳۶).

۲-۵. جمع بندی

در مجموع مطالعات ذکر شده نشان دهنده اهمیت شناسایی سویه های استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشند، چرا که شناسایی سویه ها در جریان در بیمارستان‌ها و جامعه و همچنین سویه های مشترک، به کنترل اپیدمی ها، کنترل و درمان عفونت چه در بیمارستان و چه در جامعه کمک می کند. اگرچه مطالعاتی در زمینه شناسایی این سویه ها و استفاده از روش‌های تایپینگ مختلف صورت گرفته ولیکن در مطالعه ما از روش تایپینگ *dru* جهت شناسایی سویه های MRSA که مطالعات محدودی در ایران بر روی این روش صورت گرفته است، استفاده شد. علاوه بر این در جستجوهای پژوهشگر، مطالعه ای که از سه روش ذکر شده جهت شناسایی سویه ها انجام شده باشد، یافت نگردید. بنابراین محقق بر آن شد تا به بررسی تایپینگ مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه های بستری و سرپایی بیمارستان آموزشی الزهرای اصفهان با استفاده از روش‌های *dru*, *spa*, *agr* پردازد.

¹ . R.V.Goering

فصل سوم

روش‌شناسی پژوهش

۳-۱. نوع مطالعه

این مطالعه از نوع مقطعی^۱ می باشد که به روش توصیفی - تحلیلی طراحی و اجرا گردید. جمعیت آماری مورد مطالعه بیماران بستری و سرپایی در بیمارستان الزهراء اصفهان در سال ۱۳۹۸-۱۳۹۹ بودند.

۳-۲. حجم نمونه

بر اساس مطالعات انجام شده در این زمینه با توجه به مطالعات قبلی و با استفاده از فرمول زیر حجم نمونه مورد نظر ۱۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس تعیین شده است. که در دو گروه بستری و سرپایی، هر کدام شامل ۷۵ سویه جمع آوری شدند.

$$n = \frac{z^2 pq}{d^2}$$

(۱) z : سطح اطمینان $95\% = 1.96$

(۲) p : پراکندگی مورد انتظار $= 0.5$

(۳) d : درصد خطا $= 0.08$

(۴) $q: 1-p$

سطح اطمینان با یک Z-score در نظر گرفته می شود که مقداری ثابت برای استفاده در فرمول حجم نمونه است. به عبارتی 95 Z-score درصد برابر است با $Z \text{ Score} = 1.96$.

p : پراکندگی مورد انتظار: این نوع اطلاعات معمولاً از تحقیقات قبلی حاصل می شود. اگر در این زمینه اطلاعاتی در دست ندارید، بهتر است از ۰.۵ استفاده کنید. این مقدار تضمین می کند که نمونه شما به اندازه کافی بزرگ باشد. و اما اگر بخواهید از نمونه برای تخمین یک نسبت (p) در جامعه استفاده کنید باید پیش برآوردی از این نسبت را استفاده کنید، در این مورد نیز بهترین و محافظه کارترین انتخاب، مقدار ۰.۵ است.

¹ Cross sectional

حاشیه‌ی خطا (بازه اطمینان) (d): هیچ نمونه‌ای ایده‌آل نیست، بنابراین باید تصمیم بگیرید که چه میزان خطا در اندازه‌گیری شاخص مورد نظر شما مجاز است.

۳-۳. روش نمونه‌گیری

در این مطالعه تعداد ۱۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس که در دو گروه بستری و سرپایی، هر کدام شامل ۷۵ ایزوله جمع‌آوری شدند. نمونه‌های کلینیکی شامل خون، ادرار، زخم، مایع مغزی-نخاعی و تراشه از بخش‌های مختلف بیمارستان الزهراء اصفهان جمع‌آوری، سپس به آزمایشگاه بیمارستان ارجاع داده شدند. نمونه‌های سرپایی نیز از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان بدون سابقه بستری در طی یک‌ماه گذشته جمع‌آوری گردید.

۳-۴. معیارهای ورود به مطالعه

ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان الزهراء اصفهان
ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران سرپایی در بیمارستان الزهراء اصفهان

۳-۵. معیارهای خروج از مطالعه

ایزوله‌های غیر از استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری و سرپایی در بیمارستان الزهراء اصفهان

بیماران بستری و سرپایی با سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک در طی ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌گیری

بیماران سرپایی با سابقه بستری در طی یک‌ماه گذشته قبل از نمونه‌گیری

۳-۶. روش جمع آوری اطلاعات

جمع آوری نمونه‌ها بستری و سرپایی از بیمارستان الزهراء اصفهان و گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس نوع نمونه بالینی

انجام تست‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس.

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از دیسک سفوکسیتین و روش PCR جهت شناسایی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین

انجام تایپینگ مولکولی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های *spa agr* و *dru*

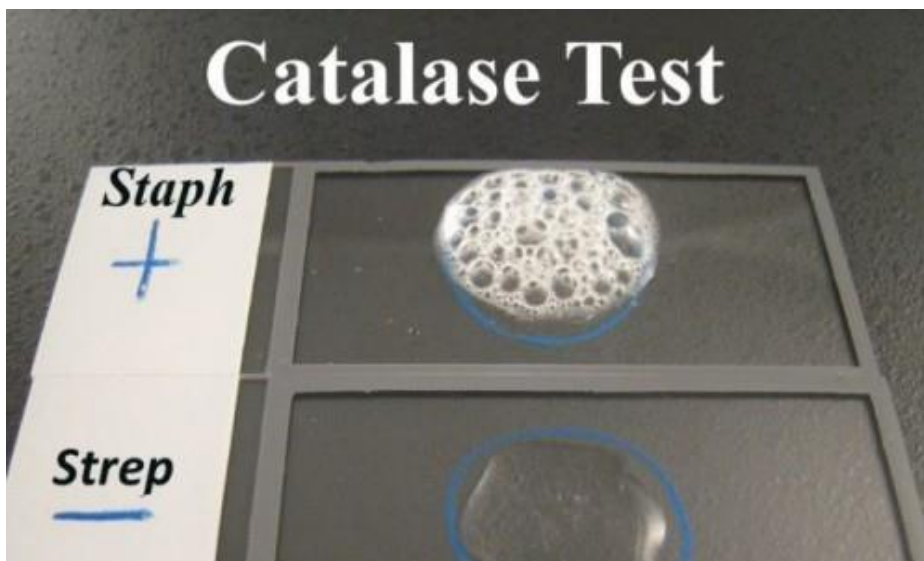
۳-۷. روش اجراء

نمونه‌های بالینی بستری و سرپایی از بیمارستان الزهراء اصفهان جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از کشت بر روی محیط مانیتول سالت آگار به آزمایشگاه میکرب شناسی دانشکده پزشکی اصفهان منتقل شده و پس از انکوباسیون بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کلنی‌های مشکوک به کوکوس گرم مثبت تعیین هویت شدند. کلیه نمونه‌های بالینی که از بیمارستان الزهراء اصفهان جمع‌آوری شدند، ابتدا به منظور حصول اطمینان از خالص بودن، در محیط بلادآگار کشت داده شدند و پس از آن به منظور تعیین هویت قطعی و تأیید تشخیص، از آزمایشات تکمیلی به شرح ذیل استفاده گردید.

۳-۸. تست‌های تعیین هویت استافیلوکوکوس اورئوس

۳-۸-۱ تست کاتالاز

پس از مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت برای تفکیک استرپتوکوکوس از استافیلوکوکوس از تست کاتالاز استفاده شد. در این آزمایش کلنی باکتری در قطره‌های از آب اکسیژنه ۳ درصد بر روی لام شیشه‌ای تمیزی حل شدند. تشکیل حباب در سطح لام، نشانه مثبت بودن آزمایش می‌باشد (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱. تست کاتالاز جهت تفکیک استرپتوکوکوس از استافیلوکوکوس.

۳-۸-۲. تست کواگولاز

پلاسمای لیوفیلزه خرگوش را با اضافه کردن آب مقطر براساس دستورالعمل کارخانه سازنده به صورت تازه تهیه نموده و ابتدا سوبه‌ها را به روش اسلاید آزمایش کرده و در صورت منفی بودن روش اسلاید از روش لوله‌ای استفاده شد. در این روش باکتری را به ۰/۵ سی سی پلاسمای خرگوش اضافه و به مدت ۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از زمان انکوباسیون در صورت عدم مشاهده لخته و منفی بودن، یک شبانه روز در درجه حرارت اتاق انکوبه شده و در صورت عدم وجود لخته، منفی تلقی گردید. این تست جهت افتراق استافیلوکوکوس اورئوس که کواگولاز مثبت می‌باشد از سایر استافیلوکوکوس‌ها انجام شد.

۳-۸-۳. آزمایش DNase

استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تولید آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز می‌باشد که باعث هیدرولیز DNA می‌شود. باکتری مورد نظر را بروی محیط DNase به صورت خطی کشت داده و برای مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس بر روی آن اسیدکلریدریک یک نرمال اضافه گردید. مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز در باکتری می‌باشد.

۳-۸-۴. تست تخمیر مانیتول

محیط مانیتول سالت آگار یک محیط انتخابی و افتراقی برای ردیابی استافیلوکوک‌ها از نمونه‌های بالینی و غیربالینی است. فقط استافیلوکوکوس‌ها می‌توانند روی محیط آگار حاوی ۷.۵ درصد کلرید سدیم رشد نمایند. چاپمن نشان داد که اضافه نمودن ۷.۵ درصد کلرید سدیم به محیط فنل رد مانیتول سالت آگار می‌تواند برای جدا نمودن استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت به کار رود. کلرید سدیم موجود در محیط از رشد همه‌ی باکتری‌ها به جز استافیلوکوکوس‌ها جلوگیری می‌نماید. در بین استافیلوکوکوس‌ها نیز فقط *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به تخمیر مانیتول می‌باشد. این محیط به رنگ قرمز مایل به صورتی است. استافیلوکوکوس اورئوس بعد از رشد روی محیط، ایجاد کلنی‌های رنگ زرد می‌نماید. در صورت مثبت بودن آزمایش ممکن است تمام یا قسمتی از محیط به رنگ زرد در آید. یک کلنی از باکتری توسط آنس در سطح و عمق محیط مانیتول سالت آگار در لوله تلقیح شد (محیط مانیتول سالت آگار در لوله به صورت شیب دار تهیه شد). سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در اثر تخمیر قند مانیتول توسط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* هم در سطح و هم در عمق محیط کشت (هوازی بی هوازی اختیاری) رنگ زرد ظاهر شد.

۳-۸-۵. ذخیره سازی باکتری

یک کلنی از کشت خالص هر کدام از ایزوله‌ها که توسط تست‌های تشخیصی *استافیلوکوکوس اورئوس* بودن آنها محرز شده بود در ۵۰۰ میکرولیتر از محیط TSB تلقیح گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و رشد باکتری به محیط مذکور ۲۰ درصد گلیسرول به هر کدام از تیوب‌ها اضافه شد و در فریزر منهای ۷۰ برای انجام مراحل بعدی ذخیره گردید.

۳-۹. ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

محیط کشت مورد استفاده مولر هیتون آگار بوده که طبق دستور کارخانه سازنده ۳۷ گرم از آن را در یک لیتر آب مقطر حل نموده و سپس توسط اتوکلاو استریل شد. پس از تهیه محیط کشت مولر هیتون آگار، سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از باکتری ۱۸-۲۴ ساعته تهیه شد. سپس یک سوپ استریل داخل سوسپانسیون فرو برده و آن را به جدار لوله فشار داده، تا مایع اضافی گرفته شود و بعد با آن روی سطح محیط مولر هیتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. حال به کمک پنس استریل دیسک-های آنتی‌بیوتیکی را یکی یکی برداشته و روی محیط جامد به طوری که فاصله هر دیسک از لبه پلیت ۱۵ میلی متر و فاصله مرکز یک دیسک با مرکز دیسک دیگر ۲۴ میلی متر باشد، قرار داده شد. دیسک های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه شامل لینزولید (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۳.۷۵/۱.۲۵ میکروگرم)، تیکوپلانین (۳۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵μg)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم) و کوینوپریستین-دالفوپریستین (۱۵ میکروگرم) بودند.

لازم به ذکر است دیسک‌ها یک ساعت قبل از استفاده در دمای محیط قرار گرفتند. ۱۵ دقیقه پس از گذاشتن دیسک‌ها، پلیت‌ها ۱۸-۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها با خط کش اندازه‌گیری شد. بر اساس استاندارد CLSI در مورد قطر هاله‌ی اطراف هر دیسک یا منطقه‌ی ممانعت از رشد می‌توان الگوی حساسیت باکتری نسبت به آن دیسک آنتی‌بیوتیک را به صورت مقاوم^۱، حدواسط^۲ و حساس^۳ مشخص نمود. از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 جهت کنترل این آزمون استفاده گردید.

۳-۹-۱. غربالگری ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین

ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس تایید شده به کمک تست‌های بیوشیمیایی در این مرحله بوسیله دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرمی جهت تعیین ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین غربالگری شدند. با توجه به قطر هاله‌های مشاهده شده مطابق با معیارهای ذکر شده در استاندارد CLSI ایزوله‌های مقاوم

¹ Resistance

² Intermediate

³ Susceptible

به متی سیلین از ایزوله‌های حساس به متی سیلین افتراق داده شدند. بر این اساس سویه‌هایی که قطر هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۲۱ میلی‌متر داشته باشند مقاوم به متی سیلین و سویه‌های با قطر هاله ۲۲ یا بالاتر حساس به متی سیلین در نظر گرفته شدند.

۱۰-۳. انجام روش‌های مولکولی

۱-۱۰-۳. استخراج DNA

برای تعیین هویت قطعی سویه‌ها، ابتدا DNA باکتری با استفاده از کیت استخراج کباژن (Qiagen, QIAamp Hilden Germany) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و پس از تایید خلوص DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری، از تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردید. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این طرح در جدول ۱-۳ نشان داده شده است.

جدول ۱-۳. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

Primer	Sequence (5'- 3')	Amplicon size (bp)	References
<i>nuc F</i> <i>nuc R</i>	CTGGCATATGTATGGCAATTGTT TATTGACCTGAATCAGCGTTGTCT	613	(۳۶)
<i>mecA F</i> <i>mecA R</i>	GATGAAATGACTGAACGTCCGATAA CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	(۳۶)
<i>spa F</i> <i>spa R</i>	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	300-600	(۳۷)
<i>dru F</i> <i>dru R</i>	GTTAGCATATTACCTCTCCTTGC GCCGATTGTGCTTGATGAG	500-900	(۳۷)
<i>agrI F</i> <i>agrI R</i>	ATGCACATGGTGACATGC GTCACAAGTACTATAAGCTGCGA	441	Philippe Gilot
<i>agrII F</i> <i>agrII R</i>	ATGCACATGGTGACATGC TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	575	Philippe Gilot
<i>agrIII F</i> <i>agrIII R</i>	ATGCACATGGTGACATGC GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	323	Philippe Gilot
<i>agrIV F</i> <i>agrIV R</i>	ATGCACATGGTGACATGC CGATAATGCCGTAATACCCG	659	Philippe Gilot

۳-۱۰-۲. واکنش PCR ژن استافیلوکوکوس اورئوس

جهت تایید مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس از تکثیر ژن nuc استفاده گردید. برای به دست آوردن مقادیر مناسب ترکیبات مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز گرادیانته از ترکیبات مختلف قرار داده شد. پس از بدست آمدن مقادیر مناسب مستر میکس برای هر واکنش تهیه و استفاده شد. حجم نهایی برای هر واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. از مستر میکس آماده شرکت Amplicon دانمارک جهت انجام واکنش PCR استفاده گردید. شرایط انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر Biorad در جدول ۳-۲ نشان داده شده است. اندازه محصول PCR برای این ژن ۶۶۴bp بود.

جدول ۳-۲ برنامه حرارتی ترموسایکلر برای ژن nuc/استافیلوکوکوس اورئوس

مراحل	درجه حرارت °C	زمان	تعداد سیکل ها
واسرشته شدن اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشته شدن	۹۴	۳۰s	۳۵
اتصال	۵۶	۴۰s	
گسترش	۷۲	۴۰s	
گسترش نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

۳-۱۰-۳. شناسایی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین با روش PCR

پس از تایید فنوتیپی، تمامی ایزوله‌ها به روش ژنوتیپی و با استفاده از تکنیک PCR برای وجود ژن *mecA* بررسی شدند. محصول PCR ژن *mecA*/استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه‌ای به طول ۳۱۰ جفت باز بود. شرایط دمایی واکنش PCR در جدول ۳-۳ نشان داده

شده است. ایزوله‌های تایید شده به عنوان MRSA در محیط تریپتیکیس سوی برات^۱ (Germany, Merck حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد برای انجام سایر آزمایش‌ها و تست- های مولکولی ذخیره شدند.

جدول ۳-۳ برنامه حرارتی ترموسایکلر برای ژن استافیلوکوکوس اورئوس

تعداد سیکل‌ها	زمان	درجه حرارت °C	مراحل
۱	۵ دقیقه	۹۵	واسرشته شدن اولیه
۳۲	۳۰s	۹۴	واسرشته شدن
	۳۰s	۵۸	اتصال
	۳۰s	۷۲	گسترش
۱	۶ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی

۳-۱۱. تایپینگ مولکولی

۳-۱۱-۱. روش *agr* تایپینگ

برای تکثیر ژن *agr* در ایزوله‌ها از یک پرایمر *forward* و چهار پرایمر *reverse* که هرکدام اختصاص به یکی از گروه‌های استافیلوکوکوس اورئوس داشت و توسط فیلیپ ژیلو^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۲ طراحی شده بود، استفاده شد (جدول ۳-۱). برنامه دمایی برای این واکنش PCR در جدول ۳-۴ نشان داده شده است. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد مشاهده گردید.

^۱ TSB

^۲ Philippe Gilot

جدول ۳-۴. برنامه حرارتی ترموسایکلر برای استافیلوکوکوس اورئوس تایپینگ

مراحل	درجه حرارت °C	زمان	تعداد سیکل ها
واسرشته شدن اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
واسرشته شدن	۹۴	۳۰s	۲۶
اتصال	۵۵	۳۰s	
گسترش	۷۲	۶۰s	
گسترش نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

۳-۱۱-۲. روش *spa* تایپینگ

جهت تکثیر ناحیه متغیر X ژن پروتئین A در ایزوله‌های MRSA از روش PCR، همانگونه که قبلاً توصیف شده است [۱۷] استفاده شد. اندازه محصول PCR با توجه به متغیر بودن ناحیه X ژن پروتئین A بین ۳۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز در نظر گرفته شد.

تعیین توالی محصول PCR توسط شرکت نیاژن (تهران، ایران) با روش خاتمه زنجیره دی دئوکسی با استفاده از دستگاه Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) انجام شد. تیپ‌بندی ایزوله‌ها بر اساس آنالیز نتایج تعیین ترادف با برنامه Ridom Staphtype software (version 1.4; Ridom, GmbH, Wurzburg, Germany) انجام گردید.

۳-۱۱-۳. روش *dru* تایپینگ

جهت تایپینگ ایزوله‌ها با روش استافیلوکوکوس اورئوس، از روش PCR استفاده شد (Goering). واکنش PCR با شرایط ذکر شده در جدول ۳-۵ انجام گردید. طول محصول PCR جهت تکثیر ناحیه *dru*، بین ۵۰۰ تا ۸۰۰ جفت باز بود. محصولات PCR ناحیه *dru* توسط شرکت نیاژن، ایران تعیین توالی گردید. آنالیز تایپ‌های *dru* با استفاده از نرم افزار Bionumerics انجام پذیرفت. تکرارهای جدید توسط پروفیسور گورینگ^۱ تأیید و پس از نامگذاری در دیتابیس ثبت و اضافه شدند (<http://dru-typing.org/site>).

جدول ۳-۵. برنامه حرارتی ترموسایکلر برای استافیلوکوکوس اورئوس تایپینگ

تعداد سیکل‌ها	زمان	درجه حرارت °C	مراحل
۱	۲ دقیقه	۹۴	واسرشته شدن اولیه
۳۰	۱ دقیقه	۹۴	واسرشته شدن
	۱ دقیقه	۵۵	اتصال
	۱ دقیقه	۷۲	گسترش
۱	۵ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی

۳-۱۲. روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه داده‌ها وارد نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ گردید. پس از تعیین فراوانی و توزیع ایزوله‌ها، از آزمون‌های مجذور کای و دقیق فیشر با در نظر گرفتن سطح معنی داری $p \leq 0/05$ برای بررسی ارتباط بین تایپ‌های مختلف با سایر متغیرها استفاده شد.

¹ Goering

فصل چهارم

یافته‌های پژوهش

۴-۱. مقدمه

در مجموع در این مطالعه توصیفی مقطعی تعداد ۳۴۱ ایزوله اولیه استافیلوکوکوس اورئوس در مدت ۱۱ ماه جمع آوری گردید. از این میان تعداد ۱۵۰ ایزوله MRSA در دو گروه بستری و سرپایی، هر کدام شامل ۷۵ ایزوله وارد این مطالعه شدند. نمونه گیری بمدت ۱۱ ماه از دی ماه ۱۳۹۸ تا آذر ۱۳۹۹ از بیمارستان الزهراء اصفهان از بخش های جراحی، ICU، داخلی و اورژانس انجام شد. نمونه های سرپایی نیز از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بدون سابقه بستری در طی یکماه گذشته جمع آوری گردید.

۴-۲. درصد فراوانی بر اساس جنسیت

در این مطالعه از تعداد کل ۱۵۰ ایزوله MRSA در دو گروه بستری و سرپایی بررسی شدند. تعداد ۷۷ نمونه (۵۱.۳ درصد) مربوط به مردان و ۷۳ نمونه (۴۸.۷ درصد) مربوط به زنان بوده است. درصد فراوانی نمونه های مربوط به زنان و مردان به تفکیک دو گروه بستری و سرپایی در جدول ۱-۴ نشان داده شد.

جدول ۴-۱. فراوانی جنسیت بیماران در دو گروه سرپایی و بستری.

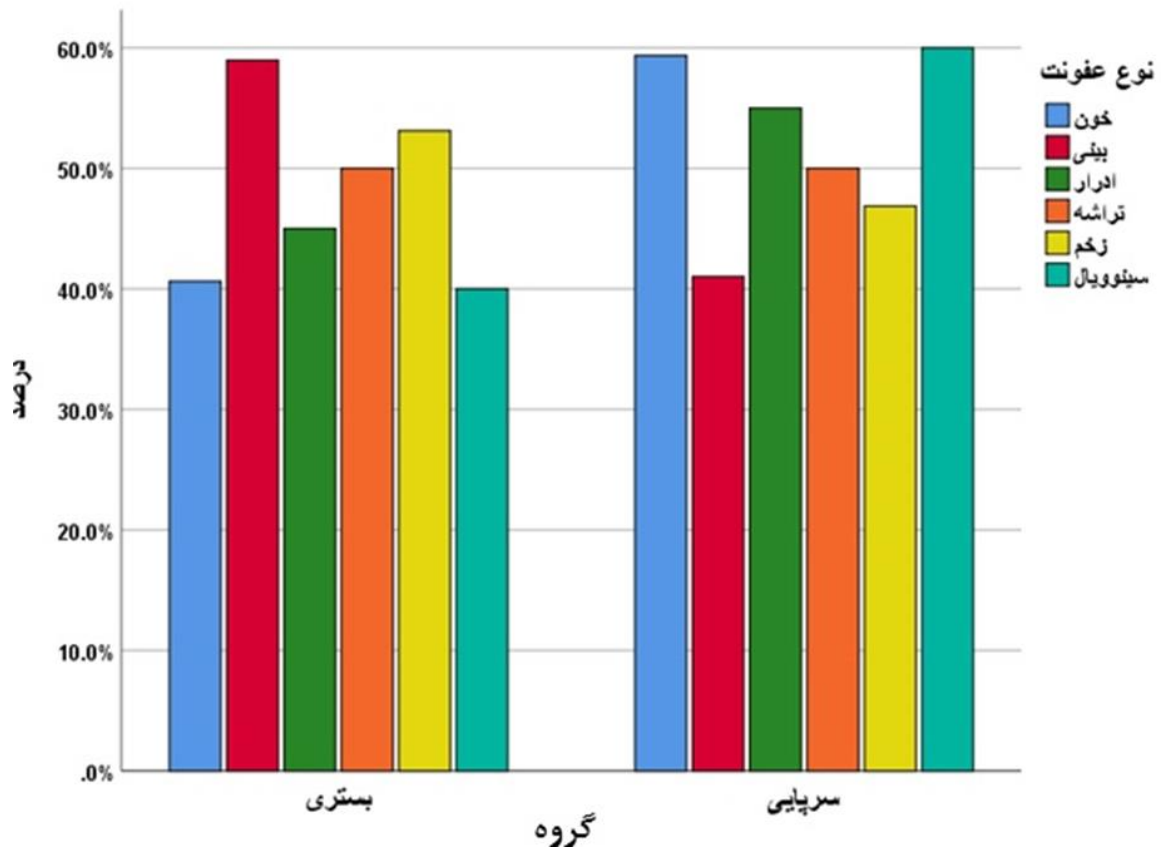
		جنسیت		
		مرد (%)	زن (%)	کل (%)
گروه	بستری	۴۵ (30)	30 (20)	75 (50)
	سرپایی	32 (21.3)	43 (28.7)	75 (50)
کل		77 (51.3)	73 (48.7)	150 (100)

۳-۴. درصد فراوانی بر اساس نوع نمونه بالینی

در این مطالعه از مجموع تعداد کل ایزوله MRSA (۱۵۰ ایزوله) درصد فراوانی انواع نمونه های بالینی شامل نمونه خون، سواب بینی، نمونه ادرار، نمونه تراشه، نمونه زخم و نمونه مایع سینوویال به ترتیب ۲۱.۳، ۲۶، ۱۳.۳، ۱۴.۷، ۲۱.۳ و ۳.۳ درصد بودند. همچنین درصد فراوانی انواع نمونه بالینی جمع آوری شده در دو گروه بستری و سرپایی تعیین گردید (جدول ۴-۲). بر همین اساس در مقایسه دو گروه بستری و سرپایی بیشترین درصد فراوانی در گروه بستری مربوط به نمونه سواب بینی با ۳۰.۷ درصد و بیشترین درصد فراوانی در گروه سرپایی مربوط به نمونه خون با ۲۵.۳ درصد می باشد (نمودار ۴-۱).

جدول ۴-۲. درصد فراوانی نوع نمونه بالینی در دو گروه سرپایی و بستری.

			نوع عفونت					کل	
			خون	بینی	ادرار	تراشه	زخم		سینوویال
گروه	بستری	تعداد	13	23	9	11	17	2	75
		درصد گروه	17.3%	30.7%	12.0%	14.7%	22.7%	2.7%	100.0%
		درصد در نوع نمونه بالینی	40.6%	59.0%	45.0%	50.0%	53.1%	40.0%	50.0%
		درصد در کل (n=150)	8.7%	15.3%	6.0%	7.3%	11.3%	1.3%	50.0%
	سرپایی	تعداد	19	16	11	11	15	3	75
		درصد در گروه	25.3%	21.3%	14.7%	14.7%	20.0%	4.0%	100.0%
		درصد در نوع نمونه بالینی	59.4%	41.0%	55.0%	50.0%	46.9%	60.0%	50.0%
		درصد در کل (n=150)	12.7%	10.7%	7.3%	7.3%	10.0%	2.0%	50.0%
کل		تعداد کل	32	39	20	22	32	5	150
		درصد کل در نوع نمونه	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		درصد کل	21.3%	26.0%	13.3%	14.7%	21.3%	3.3%	100.0%



نمودار ۴-۱. درصد فراوانی تعداد نمونه بر اساس انواع نمونه بالینی در دو گروه سرپایی و بستری.

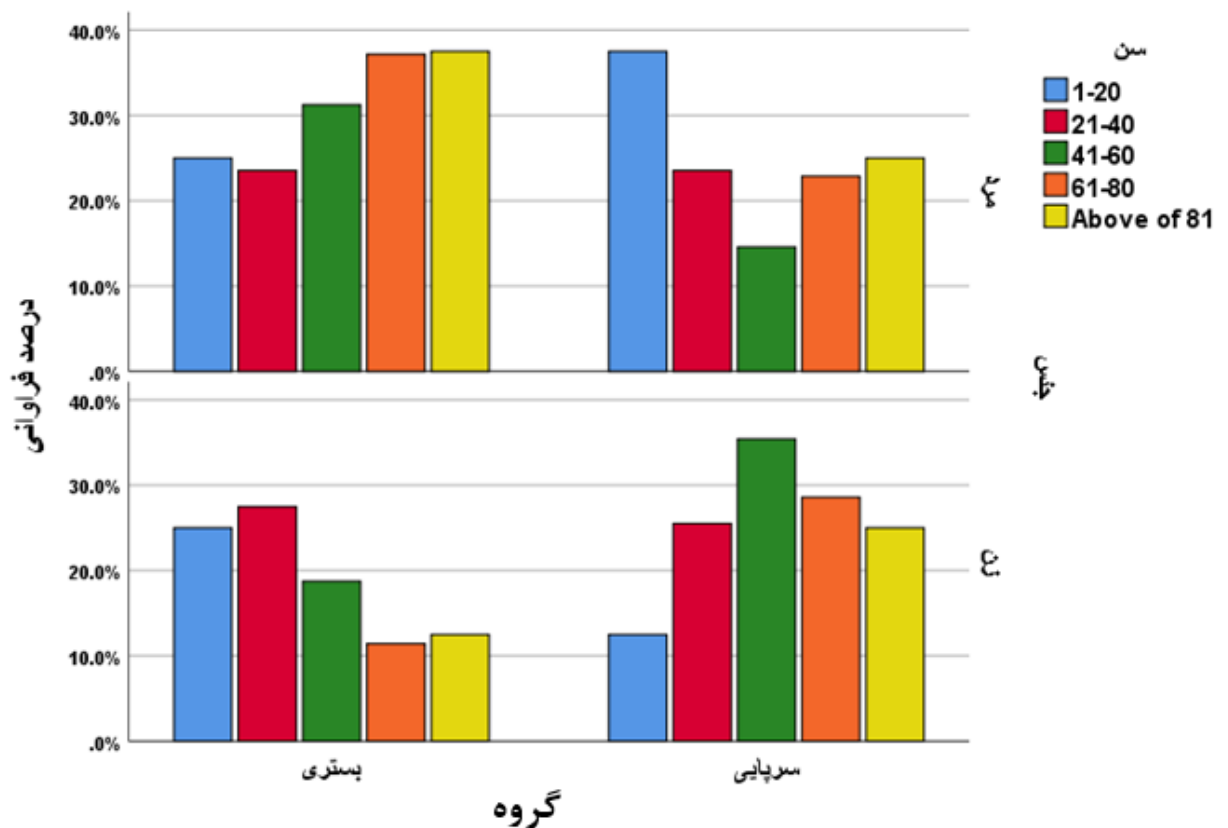
(محاسبه درصد بر اساس مقایسه بین تعداد کل نوع نمونه بالینی دو گروه بستری و سرپایی).

۴-۴. درصد فراوانی ایزوله ها در رده های سنی مختلف

از مجموع تعداد کل ایزوله MRSA (۱۵۰ ایزوله) درصد فراوانی گروه های سنی مختلف شامل ۱- ۲۰، ۲۱-۴۰، ۴۱-۶۰، ۶۱-۸۰ و بالای ۸۰ سال به ترتیب ۵.۳، ۳۴، ۳۲، ۲۳.۳، و ۵.۳ درصد بودند. همچنین درصد فراوانی گروه های سنی جمع آوری شده در دو گروه بستری و سرپایی تعیین گردید (جدول ۴-۳). بر همین اساس در مقایسه دو گروه بستری و سرپایی بیشترین درصد فراوانی در گروه بستری مربوط به گروه سنی ۲۱-۴۰ سال با ۳۴.۷ درصد و بیشترین درصد فراوانی در گروه سرپایی مربوط به گروه سنی ۲۱-۴۰ با ۳۳.۳ درصد می باشد (نمودار ۴-۲).

جدول ۴-۳. فراوانی رده های سنی مختلف در دو گروه سرپایی و بستری.

			رده سنی (سال)					کل
			1-20	21-40	41-60	61-80	Above of 81	
گروه	بستری	تعداد بستری	4	26	24	17	4	75
		درصد گروه	5.3%	34.7%	32.0%	22.7%	5.3%	100.0%
		درصد در هر رده سنی	50.0%	51.0%	50.0%	48.6%	50.0%	50.0%
		درصد در کل (n=150)	2.7%	17.3%	16.0%	11.3%	2.7%	50.0%
	سرپایی	تعداد سرپایی	4	25	24	18	4	75
		درصد در گروه	5.3%	33.3%	32.0%	24.0%	5.3%	100.0%
		درصد در هر رده سنی	50.0%	49.0%	50.0%	51.4%	50.0%	50.0%
		درصد در کل (n=150)	2.7%	16.7%	16.0%	12.0%	2.7%	50.0%
کل	تعداد کل	8	51	48	35	8	150	
	درصد کل در هر رده سنی	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	
	درصد کل	5.3%	34.0%	32.0%	23.3%	5.3%	100.0%	



نمودار ۲-۴. مقایسه درصد فراوانی تعداد ایزوله های MRSA در رده های سنی مختلف و نوع جنسیت در دو گروه سرپایی و بستری.

۴-۵. تعیین الگوی حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها

پس از جدا سازی ایزوله‌های باکتری MRSA با استفاده از تست‌های غربالگری بیوشیمیایی و خواص کلنی‌ها بر روی محیط‌های کشت، الگوی حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف شامل لینزولید (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۳.۷۵/۱.۲۵ میکروگرم)، تیکوپلانین (۳۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰

میکروگرم)، ریفامپین ($\mu\text{g}5$)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم) و کوینوپریستین-دالفوپریستین (۱۵ میکروگرم)، توسط روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید که در جدول ۴-۴ نشان داده شده است. در این مطالعه تمامی ایزوله های MRSA اعم از بستری و سرپایی به لیزولید، کوینوپریستین-دالفوپریستین و تیکوپلانیل حساس بودند. همچنین تمامی ایزوله های MRSA به سفوکسیتین مقاوم بودند.

جدول ۴-۴. درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در دو گروه بستری و سرپایی (تمام اعداد با درصد نشان داده شدند).

	بستری		سرپایی		مجموع دو گروه		P-value
	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس	
آنتی بیوتیک							
اریترومایسین	42	8	46	4	88	12	P < 0.132
کلیندامایسین	39.3	10.7	47.3	2.7	87	13	P < 0.004
ریفامپین	26/7	23/3	30/7	19/3	57	43	P < 0.322
تتراسیکلین	36	14	32	18	68	32	P < 0.294
جنتامایسین	30/7	19/3	24	26	55	45	P < 0.101
تری متوپریم/سولفومتوکسازول	22.7	27.3	27.3	22.7	50	50	P < 0.253

بر اساس نتایج بدست آمده از روش دیسک دیفیوژن، ایزوله های MRSA در گروه بستری به آنتی بیوتیک های اریترومایسین (۴۲ درصد)، کلیندامایسین (۳۹.۳ درصد) و تتراسیکلین (۳۶ درصد) بیشترین مقاومت را داشتند. همچنین ایزوله های MRSA در گروه بیماران سرپایی به آنتی بیوتیک های اریترومایسین (۴۶ درصد)، کلیندامایسین (۴۷.۳ درصد) و تتراسیکلین (۳۲ درصد) بیشترین مقاومت را

داشتند. از طرفی بیشترین میزان مقاومت در مجموع دو گروه بستری و سرپایی در آنتی بیوتیک‌های اریترومايسين (۸۸ درصد)، کلیندامایسین (۸۷ درصد) و تتراسیکلین (۶۸ درصد) مشاهده شد. از ۱۵۰ ایزوله MRSA، ۱۴۰ (۹۳.۳ درصد) دارای مقاومت چندگانه^۱ (MDR) بودند (بر اساس نتایج آنتی بیوگرام باکتری‌هایی که حداقل به سه آنتی بیوتیک مختلف از حداقل ۲ کلاس مقاوم بودند). از مجموع ۱۴۰ فنوتیپ MDR تعداد ۲۰ (۱۴.۳ درصد) ایزوله حداقل به ۷ آنتی بیوتیک از ۱۰ آنتی بیوتیک مورد استفاده مقاومت نشان دادند (جدول ۴-۵).

^۱ Multidrug-resistant

جدول ۴-۵. درصد فراوانی فنوتیپ چندگانه مقاومت آنتی بیوتیکی MDR ایزوله های MRSA

MDR phenotypes	Number of antibiotic resistant	Frequency (%)
FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA	7	20 (14.3)
FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE	6	13 (9.3)
FOX, ERY, CD, SXT, GM, RA		9 (6.4)
FOX, ERY, CD, SXT, TE, RA		8 (5.7)
FOX, ERY, CD, GM, TE, RA		12 (8.6)
FOX, ERY, CD, SXT, GM	5	2 (1.4)
FOX, ERY, CD, SXT, RA		8 (5.7)
FOX, ERY, CD, SXT, TE		10 (7.1)
FOX, ERY, CD, GM, RA		5 (3.6)
FOX, ERY, CD, GM, TE		10 (7.1)
FOX, SXT, GM, TE, RA		1 (0.7)
FOX, ERY, CD, TE, RA		10 (7.1)
FOX, ERY, SXT, GM	4	1 (0.7)
FOX, ERY, CD, SXT		4 (2.9)
FOX, ERY, CD, GM		3 (2.1)
FOX, SXT, GM, RA		1 (0.7)
FOX, ERY, CD, RA		6 (4.3)
FOX, ERY, CD, TE		8 (5.7)
FOX, CD, TE, RA		1 (0.7)
FOX, ERY, GM	3	2 (1.4)
FOX, ERY, TE		2 (1.4)
FOX, CD, SXT		1 (0.7)
FOX, GM, RA		1 (0.7)
FOX, CD, TE		1 (0.7)
FOX, TE, RA		1 (0.7)
Total		140 (100)

FOX; Cefoxitin, ERY; Erythromycin, CD; Clindamycin, SXT; Trimethoprim/sulfamethoxazole, GM; Gentamicin, TE; Tetracycline, RA; Rifampin.

۶-۴. فراوانی ژن های مقاومت و ژن های ویروالانس

شیوع ژن های مقاومت به ماکرولیدهای *ermA*، *ermB* و *ermC* در سویه های MRSA به ترتیب ۷۵ ایزوله (۵۰ درصد)، ۵۰ ایزوله (۳۳.۳ درصد) و ۸۶ ایزوله (۵۷ درصد) بود. علاوه بر این، ۱۱۷ ایزوله از ۱۵۰ ایزوله MRSA (۷۸ درصد) دارای ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزید، با حضور ژن های *aac6/aph2*، *aph3* و *ant4* به ترتیب تعداد ۸۱ ایزوله (۵۴ درصد)، ۴۹ ایزوله (۳۲.۶ درصد) و ۴۷ ایزوله (۳۱.۳ درصد) بودند. همچنین مقایسه درصد فراوانی این ژن ها در دو گروه سرپایی و بستری در جدول ۶-۴ نشان داده شد.

جدول ۶-۴. درصد فراوانی ژن های مقاومت در دو گروه سرپایی و بستری.

نوع ژن مقاومت	بستری		سرپایی		مجموع دو گروه		استاتیلوکوکوس اورئوس
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
<i>aph3</i>	۱۹/۳	۳۰/۷	۱۳/۳	۳۶/۷	۳۲/۶	۶۷/۴	P < 0.117
<i>ant4</i>	۱۴	۳۶	۱۷/۳	۳۲/۷	۳۱/۳	۶۸/۷	P < 0.379
<i>aac6/aph2</i>	۲۸/۷	۲۱/۳	۲۵/۳	۲۴/۷	۵۴	۴۶	P < 0.413
<i>ermA</i>	۲۰/۷	۲۹/۳	۲۹/۳	۲۰/۷	۵۰	۵۰	P < 0.034
<i>ermB</i>	۱۵/۳	۳۴/۷	۱۸	۳۲	۳۳/۳	۶۶/۷	P < 0.488
<i>ermC</i>	۲۸/۷	۲۱/۳	۲۸/۳	۲۱/۷	۵۷	۴۳	P < 0.561

در این مطالعه، ژن های کد کننده انتروتوکسینهای استافیلوکوکی *sea*، *seb* و *sec* به ترتیب در ۷۲ (۴۸ درصد)، ۳۸ ایزوله (۲۵.۳ درصد) و ۱۸ ایزوله (۱۲ درصد) یافت شدند. ژن *pvl* در ۲۵.۴ درصد (۳۸/۱۵۰) از ایزوله های های MRSA یافت شد، در حالی که در ۳۲.۷ درصد (۴۹/۱۵۰) از ایزوله ها ژن تولید توکسین *tst* یافت شد. همچنین مقایسه درصد فراوانی این ژن ها در دو گروه سرپایی و بستری در جدول ۴-۷ نشان داده شد. ژن فاکتور ویروانس همولیزین A در بیش از ۹۳ درصد ایزوله های MRSA یافت گردید.

جدول ۴-۷. درصد فراوانی ژن های ویروانس در دو گروه سرپایی و بستری.

نوع ژن ویروانس	بستری		سرپایی		مجموع دو گروه		استافیلوکوکوس اورنوس
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
<i>pvl</i>	۱۴/۷	۳۵/۳	۱۰/۷	۳۹/۳	۲۵/۴ ۷۴/۶		P < 0.260
<i>tst</i>	۱۶	۳۴	۱۶/۷	۳۳/۳	۳۲/۷ ۶۷/۳		P < 0.862
<i>hla</i>	۴۶	۴	۴۷/۳	۲/۷	۹۳/۳	۴۶/۷	P < 0.513
<i>sea</i>	۲۴/۷	۲۵/۳	۲۳/۳	۲۶/۷	۴۸	۵۲	P < 0.744
<i>seb</i>	۱۳/۳	۳۶/۷	۱۲	۳۸	۲۵/۳	۷۴/۷	P < 0.707
<i>sec</i>	۴	۴۶	۸	۴۲	۱۲	۸۸	P < 0.132

۷-۴. فراوانی تایپ های SCCmec

SCCmec نوع III در ۶۳.۳ درصد (۹۵/۱۵۰) از ایزوله های MRSA یافت شد. همچنین از ۱۵۰ ایزوله، ۱۶ ایزوله (۱۰.۷ درصد) به عنوان SCCmec تایپ II و IX، ۱۴ ایزوله (۹.۳ درصد) به عنوان SCCmec تایپ V، ۶ ایزوله (۴ درصد) به عنوان SCCmec تایپ I و ۳ ایزوله (۲ درصد) به عنوان SCCmec تایپ IV شناسایی شدند. همچنین درصد فراوانی تیپهای مختلف SCCmec در دو گروه سرپایی و بستری در جدول ۸-۴ نشان داده شده است.

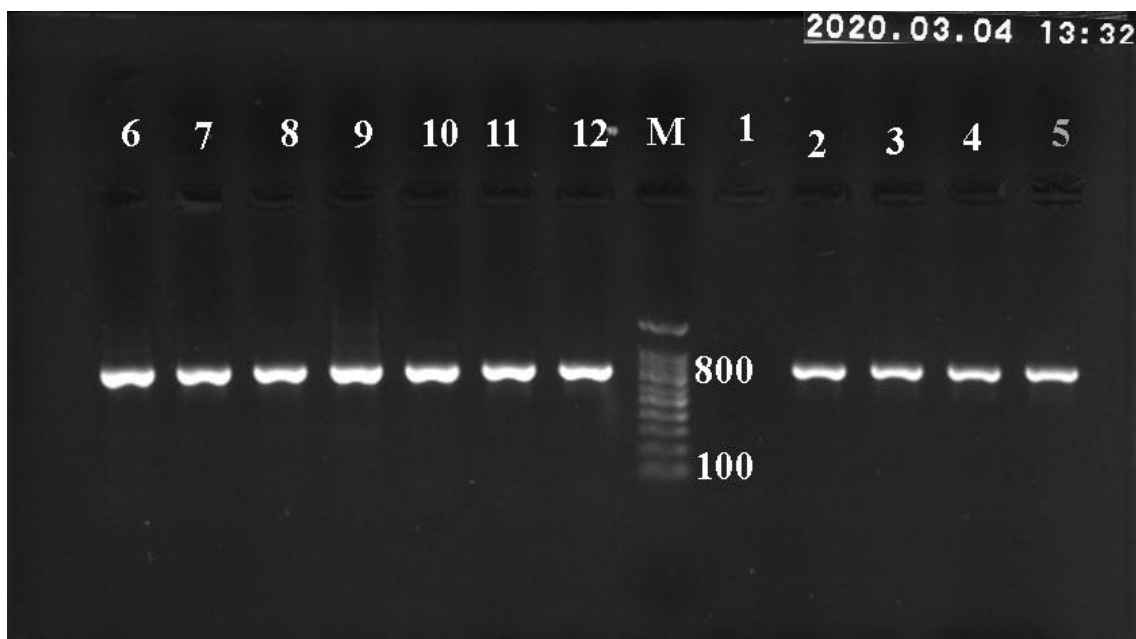
جدول ۸-۴. درصد فراوانی تیپهای مختلف SCCmec در دو گروه سرپایی و بستری.

			تیپ SCCmec						کل
			I	II	III	IV	V	IX	
گروه	بستری	تعداد	3	9	49	0	6	8	75
		درصد	2.0%	6.0%	32.7%	0.0%	4.0%	5.3%	50.0%
	سرپایی	تعداد	3	7	46	3	8	8	75
		درصد	2.0%	4.7%	30.7%	2.0%	5.3%	5.3%	50.0%
کل		تعداد کل	6	16	95	3	14	16	150
		درصد کل	4.0%	10.7%	63.3%	2.0%	9.3%	10.7%	100.0%

۴-۸. نتایج *dru* تایپینگ

نتایج PCR برای ژن *dru* در شکل ۴.۱ نشان داده شد. در این مطالعه ۲۴ تایپ مختلف استافیلوکوکوس اورئوس در بین ۵۵ ایزوله MRSA توالی‌یابی شده شناسایی گردید. هشت تایپ جدید *dru* شناسایی و به پایگاه داده *dru* تایپینگ اضافه شدند. این تایپ‌های جدید شامل، dt7al, dt9bx, dt11dt, dt11ds, dt11dv, dt11du و dt9bz می‌باشند. علاوه بر این، دو تکرار جدید *dru* در dt9bx (1h) و dt9bz (3ad) یافت شد. همه این توالی‌های تایپ‌های جدید *dru* در پایگاه داده NCBI ثبت شده و به ترتیب دارای کد دسترسی ON638969، ON638970، ON638971، ON638972، ON638973، ON638974، ON638975 و ON638976 می‌باشند. فراوان‌ترین تایپ استافیلوکوکوس اورئوس، dt8i با ۱۸.۲ درصد در تایپ‌های مختلف SCCmec شناسایی شد. در شکل ۴-۱ شباهت همه تایپ‌های *dru* با رسم درخت فیلوژنتیکی نشان داده شد.

همچنین ارتباط بین انواع نمونه بالینی با تایپ‌های مختلف *dru* بررسی گردید (جدول ۴-۹). بر همین اساس dt8h با نمونه سواب بینی بشتترین ارتباط را نشان داد. همچنین dt8i بیشتر مربوط به نمونه‌های زخم و تراشه بودند در حالی که dt10m و dt11ce می‌توانند در انواع نمونه‌های بالینی مختلف وجود داشته باشند. بنابراین، این نتایج حاکی از ارتباط بین تایپ‌های مختلف *dru* با انواع نمونه بالینی می‌باشد.



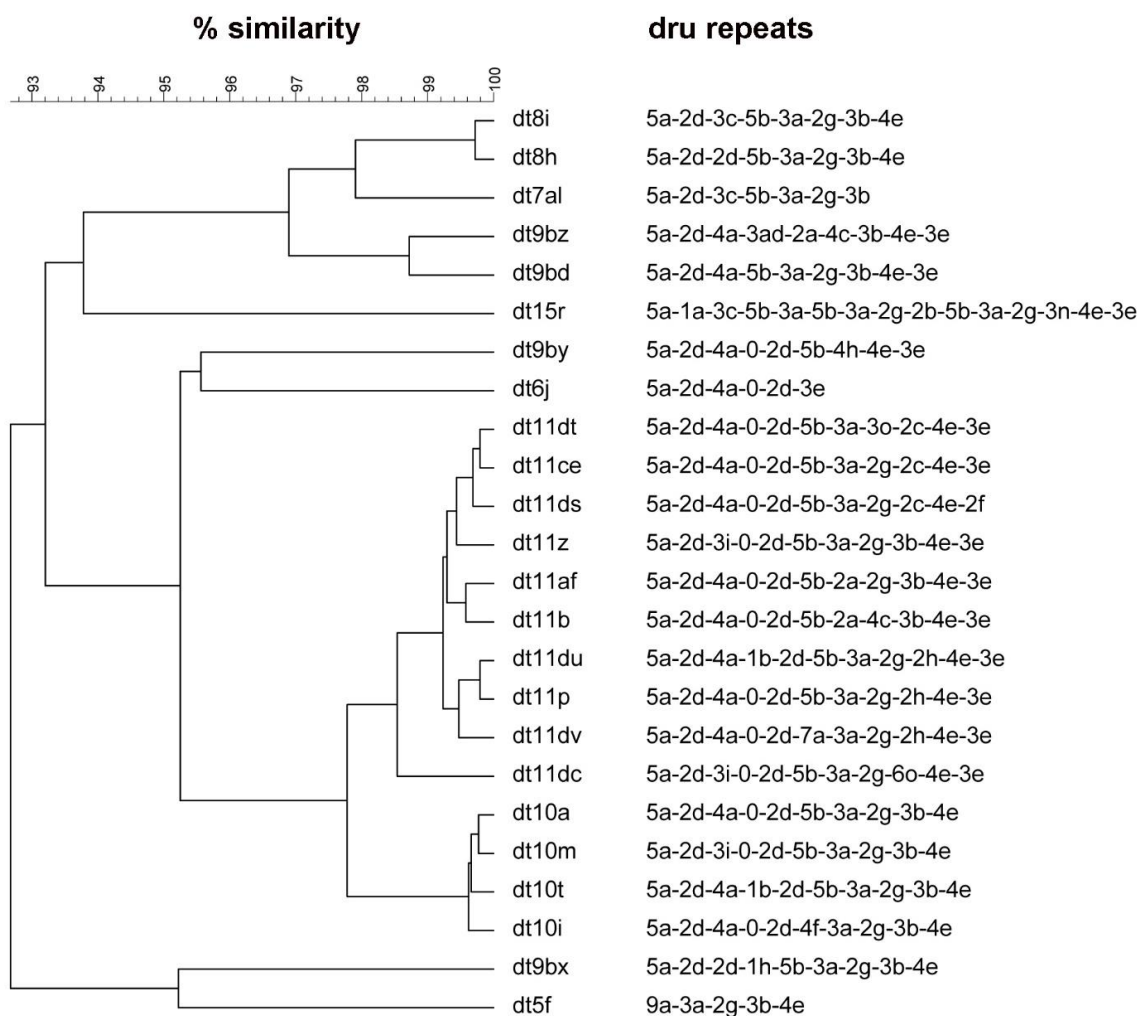
شکل ۴-۱. نتایج PCR برای ژن *dru*.

شماره ۱ کنترل منفی، شماره M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۲ تا ۱۲ ایزوله‌های مختلف دارای ژن

dru

جدول ۴-۹. فراوانی تایپ های مختلف *dru* در بین انواع مختلف نمونه های بالینی.

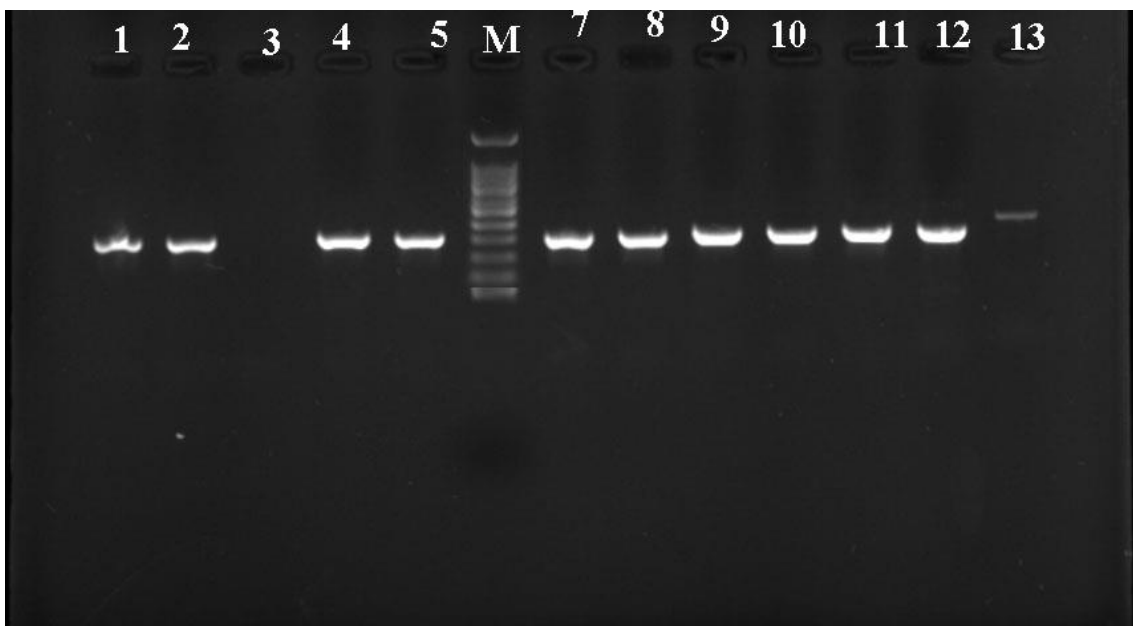
		Type of clinical specimens						Total
		Blood	Nasal	Urine	Trachea	Wound	Synovial fluid	
<i>dru</i>	dt8i	1	2	1	3	3	0	10
types	dt8h	0	4	0	0	0	0	4
	dt7al	1	0	0	1	1	0	3
	dt9bz	0	0	0	1	0	0	1
	dt9bd	0	2	2	0	0	0	4
	dt15r	0	0	0	0	1	0	1
	dt9by	1	0	0	0	0	0	1
	dt6j	1	0	0	0	0	0	1
	dt11dt	0	1	0	1	0	0	2
	dt11ce	1	1	1	0	1	0	4
	dt11ds	0	1	0	0	0	0	1
	dt11z	1	0	1	0	0	0	2
	dt11af	0	1	0	0	0	0	1
	dt11b	0	0	0	0	1	0	1
	dt11du	0	1	0	0	0	0	1
	dt11p	0	0	0	1	1	1	3
	dt11dv	1	0	0	0	0	0	1
	dt11dc	0	1	0	0	0	0	1
	dt10a	0	0	0	1	2	0	3
	dt10m	1	1	1	1	1	0	5
	dt10t	0	0	0	0	0	1	1
	dt10i	0	1	0	0	0	0	1
	dt9bx	0	0	0	0	2	0	2
	dt5f	1	0	0	0	0	0	1
Total		9	16	6	9	13	2	55



شکل ۴-۲. شباهت بیست و چهار تایپ *dru* در ۵۵ ایزوله MRSA توالی یابی شده.

۹-۴. نتایج تایپینگ *spa*

در این مطالعه بیست و هفت تایپ *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید. از این میان ۱۹ تایپ *spa* تنها یک بار (۱.۸ درصد) در تمام ۵۵ سویه مورد تجزیه و تحلیل یافت شدند. فراوانی درصد تایپ‌ها نشان می‌دهد که t030 و t037 در نمونه‌های بالینی مختلف غالب هستند (جدول ۴-۱۰). تمام سویه‌های این تایپ‌های *spa* دارای فنوتیپ MDR بودند.



شکل ۴-۳ نتایج PCR برای ژن *spa*.

شماره 3 کنترل منفی، شماره M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ و ۲ و ۴ تا ۱۳ ایزوله‌های مختلف دارای ژن *spa* بین ۳۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز.

جدول ۴-۱۰. توزیع فراوانی تایپ های *spa* در بین ایزوله های MRSA جدا شده از نمونه های بالینی

<i>spa</i> type	N (%) of isolates						Total N= 55
	Blood	Nasal	Urine	Trachea	Wound	Synovial	
t275	-	1 (100)	-	-	-	-	1
t4679	-	1 (100)	-	-	-	-	1
t7685	1 (50)	-	1 (50)	-	-	-	2
t3236	-	1 (100)	-	-	-	-	1
t790	-	1 (100)	-	-	-	-	1
t030	4 (28.6)	5 (35.7)	1(7.1)	2 (14.3)	2 (14.3)	-	14
t037	1 (12.5)	2 (25)	2 (25)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	8
t3769	-	-	-	-	-	1 (100)	1
t3204	-	1 (50)	-	-	1 (50)	-	2
t314	-	-	-	-	1 (100)	-	1
t5163	-	-	-	-	1 (50)	1 (50)	2
t325	1 (25)	-	-	1 (25)	2 (50)	-	4
t1587	-	1 (100)	-	-	-	-	1
t223	-	1 (100)	-	-	-	-	1
t5593	-	-	1 (100)	-	-	-	1
t131	-	-	-	-	1 (100)	-	1
t15871	-	-	-	1 (100)	-	-	1
t159	-	-	-	1 (100)	-	-	1
t1360	-	-	-	-	2 (100)	-	2
t692	-	1 (100)	-	-	-	-	1
t2976	-	-	1 (100)	-	-	-	1
t2104	-	-	-	-	1 (100)	-	1
t1258	-	-	-	2 (100)	-	-	2
t1403	-	1 (100)	-	-	-	-	1
t2457	1 (100)	-	-	-	-	-	1
t3182	1 (100)	-	-	-	-	-	1
t459	1 (100)	-	-	-	-	-	1
Total	10 (18.2)	16 (29)	6 (11)	8 (14.55)	12 (21.8)	3 (5.45)	55

مختلف.

۴-۱۰. نتایج تایپینگ *agr*

تشخیص مولکولی ۵۵ ایزوله MRSA نشان داد که *agr* تایپ II با ۵۴.۵ درصد تایپ غالب بوده و پس از آن تایپ I با ۳۰.۹ درصد، تایپ III با ۱۰.۹ درصد و تایپ IV با ۵.۴۵ درصد شناسایی شدند.

فصل پنجم

بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها

۱-۵. مقدمه

سویه‌های MRSA یکی از علل اصلی عفونت در بیمارستان‌ها هستند، اما عفونت‌های ناشی از MRSA مرتبط با جامعه در دهه‌های اخیر به یک تهدید جهانی برای سلامت عمومی تبدیل شده‌اند. شیوع گسترده سویه‌های MRSA مقاوم به چند دارو یا MDR هزینه درمان آنتی‌بیوتیکی را افزایش می‌دهد و گزینه‌های درمانی را برای این عفونت‌ها محدود می‌کند. در دو دهه اخیر، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بیمارستان‌ها، مراکز درمانی و مصرف بدون نسخه و خودسرانه در سطح جامعه ایران منجر به افزایش روزافزون مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. قطعات ژنتیکی SCCmec یک عنصر ژنتیکی متحرک می‌باشند که حاوی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده و نقش مهمی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تکامل MRSA و اپیدمیولوژی مولکولی بیماری‌های استافیلوکوکی ایفا می‌کند. شناسایی و درمان سریع عفونت‌های MRSA یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای جلوگیری از گسترش عفونت و کاهش خطر مرگ و میر است. سویه‌های MRSA می‌توانند به متی‌سیلین، سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شوند. بر همین اساس ایزوله‌های MRSA در مطالعه حاضر به اریترومايسين (۸۸ درصد)، کلیندامایسین (۸۶.۶ درصد)، تتراسایکلین (۶۸ درصد)، ریفاپین (۵۷ درصد) و جتتامایسین (۵۴.۶ درصد) مقاوم بودند. علاوه بر این، بیش از ۹۳ درصد از ایزوله‌های MRSA دارای فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MAR)، شناسایی شدند. خوشبختانه بر اساس این نتایج، لینزولید، کوینوپریستین/دالفوپریستین و وانکومایسین موثرترین داروها برای ایزوله‌های MRSA در منطقه مورد مطالعه می‌باشند.

در مطالعه حاضر فراوانی ایزوله‌های MRSA از کل نمونه‌های بالینی مورد مطالعه به میزان ۴۴ درصد بوده است. فراوانی سویه‌های MRSA در برخی مطالعات از ایران گزارش شده است. به عنوان مثال، یک مطالعه مروری و متاآنالیز سیستماتیک که بر روی فراوانی سویه‌های MRSA طی سال‌های ۲۰۱۶ تا ۲۰۲۰ در ایران انجام شد، نشان داد که فراوانی عفونت‌های MRSA در بین ایزوله‌های تایید شده استافیلوکوکوس اورئوس ۴۳ درصد (فاصله اطمینان ۹۵ درصد بین ۳۶-۵۰ درصد) است.

عفونت MRSA در رنج سنی ۶۰-۲۱ سال با فراوانی ۶۶ درصد بیشترین میزان را به خود اختصاص داد. علاوه بر این، میزان جداسازی MRSA از بینی (۲۶ درصد)، خون (۲۱.۳ درصد) و زخم (۲۱.۳ درصد) بود. در مطالعه‌ای که توسط Ray و همکاران انجام شد. [۲۸]، بیشترین شیوع MRSA در افراد ۱۸ تا ۵۰ ساله گزارش شده است. مقاومت بسیار بالا به اریترومايسين و کلیندامایسین در این مطالعه بسیار قابل توجه می‌باشد. به عنوان یک مهارکننده سنتز پروتئین، اریترومايسين به طور گسترده برای درمان عفونت‌های استافیلوکوک استفاده می‌شود [۲۳]. بر اساس مطالعه مهدیون و همکاران، فراوانی مقاومت MRSA آزمایش شده برای اریترومايسين ۸۴/۴ درصد بود [۲۴]. یک مطالعه انجام شده در تایوان گزارش داد که میزان مقاومت برای اریترومايسين و کلیندامایسین به ترتیب ۹۴.۹ و ۸۶.۵ درصد می‌باشد [۲۵]. فراوانی بالای مقاومت به آنتی بیوتیک‌های اریترومايسين و کلیندامایسین در مطالعه حاضر با یافته‌های تحقیقات قبلی در ایران [۲۳] و هند [۲۶] مطابقت دارد. در واقع تعدد گزارش‌های مرتبط با مقاومت بالای این دو آنتی بیوتیک نشان دهنده آن است که این دو آنتی بیوتیک عملاً در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های MRSA فاقد کارایی مناسب می‌باشند. و گزینه‌های درمانی برای این نوع عفونت‌ها بسیار محدود شده است. بنابراین با توجه به گسترش و شیوع زیاد سویه‌های MRSA، ضروری است که پزشک معالج از گلیکوپپتیدها و لینزولید فقط در مورد درمان عفونت‌های تایید شده MRSA استفاده نماید.

یافته‌های ما همچنین نشان داد که SCCmec تایپ III در ۶۳.۳ درصد (۹۵/۱۵۰) از ایزوله‌های MRSA وجود دارد. به طور مشابه، مطالعات انجام شده در ایران و سایر کشورهای آسیایی شیوع بالای SCCmec تایپ III را گزارش دادند. در ایزوله‌های MRSA، ژن *mecA* می‌تواند به عنوان مخازن بزرگی از ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، اتروتوکسین‌ها و سایر ژن‌های فاکتور ویروالانس عمل کند. طبق یافته‌های ما، رایج‌ترین ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس در میان ایزوله‌های MRSA با SCCmec تایپ III، ژن‌های *sea*، *hla* و *seb* بودند.

در مطالعه ما، اکثر ایزوله‌های MRSA با SCCmec تایپ III به اریترومایسین و کلیندامایسین (۵۵ و ۵۴ درصد) مقاوم بودند، در حالی که همه ایزوله‌های این گروه به جنتامایسین مقاوم بودند. ناحیه J3 در SCCmec تایپ III حاوی یک کپی یکپارچه از پلاسمید pT181 است که مقاومت تراسایکلین و جیوه را رمزگذاری می‌کند و ترانسپوزون Tn554 که مقاومت به اریترومایسین و اسپکتینومایسین را کد می‌کند [۳۲]. مشابه مطالعه ما، تایپینگ SCCmec در سایر مناطق ایران نیز انجام شده است. مشتاقیان و همکاران گزارش کردند که SCCmec تایپ IV در بین ایزوله‌های MRSA، نوع غالب SCCmec بود، در حالی که مطابق با یافته‌های ما، اکثر مطالعات انجام شده در ایران بیان کردند که SCCmec نوع III شایع‌ترین نوع SCCmec می‌باشد.

تایپینگ مولکولی MRSA یک رویکرد مهم برای محدود کردن گسترش پاتوژن‌ها و کاهش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی و همچنین شناسایی منشاء سویه‌ها مقاوم و در گردش می‌باشد. یک روش تایپینگ مولکولی ایده‌آل ارزان، سریع و قادر به طبقه‌بندی تمام ایزوله‌ها خواهد بود، و همچنین باید نتایج آن تکرارپذیر باشد. بنابراین، تایپینگ سریع و دقیق ایزوله‌های MRSA برای غربالگری، اپیدمیولوژی، نظارت و کنترل عفونت ضروری می‌باشد [۲۲]. تکنیک‌های مختلف ژنوتیپ برای طبقه‌بندی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس برای مطالعات اپیدمیولوژیک موجود است. روش‌های تایپینگ مبتنی بر تعیین توالی، مانند MLST، *sps* و *dru* چندین مزیت آشکار دارند. به عنوان مثال، سهولت انجام کار، دسترسی آسان به ابزار و آنالیز، قابلیت تکرارپذیری و همچنین نتایج قابل مقایسه‌ای را در مقایسه با روش‌های مبتنی بر ژل ارائه می‌دهند.

یکی از روش‌های تایپینگ سریع و آسان روش *spa* تایپینگ می‌باشد. نواحی انتخاب شده از ژن *spa* معمولاً توالی‌های تکرارهای کوتاه با پلی مورفیسم کافی برای تایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد [۲۰]. در مطالعه حاضر، ۲۷ تایپ *spa* شناسایی گردید. تجزیه و تحلیل تایپ‌های *spa* نشان داد که تایپ t030 رایج‌ترین تایپ می‌باشد که در ۲۵.۴۵ درصد ایزوله‌ها یافت شد. تایپ t037 دومین تایپ *spa* دارای بیشترین فراوانی در مطالعه حاضر بود. این نتایج با نتایج مطالعات دیگر در ایران و سایر کشورهای آسیایی مطابقت دارد [۱۰]. تایپ t037 قبلاً توسط الرشیدی و همکاران در عربستان سعودی [۳۶]، چن و همکاران در چین [۳۷] و گودرزی و همکاران در ایران گزارش گردید [۳۴]. در توافق با مطالعه ما، در چین، t030 یکی از رایج‌ترین تایپ‌های *spa* با ۵۲ درصد فراوانی در ایزوله‌های MRSA بود [۳۷]. بر همین اساس این احتمال وجود دارد که t030 باعث بقای باکتری‌ها و انتقال آسان‌تر در بین سویه‌های مختلف می‌گردد. در این مطالعه ۱۹ تایپ *spa* هر کدام فقط در یک ایزوله شناسایی شدند. ویژگی‌های تایپ‌های مختلف *spa* در جدول ۵-۱ نشان داده شد.

جدول ۵-۱. ویژگی‌های تایپ‌های مختلف *spa* در ایزوله‌های MRSA جدا شده در این مطالعه.

No isolates	<i>spa</i> type	<i>agr</i> type	Sample type	SCCmec	Virulence genes	Resistant profile
1.	t030	II	Blood	III	<i>hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
2.	t030	II	Blood	III	<i>tst</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
3.	t030	IV	Wound	III	<i>pvl, hla, sea, seb, sec</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
4.	t030	II	Trachea	III	<i>hly, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, RA
5.	t030	I	Nasal	III	<i>hly, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
6.	t030	II	Nasal	III	<i>pvl, tst, hly, sea</i>	FOX, ERY, CD, TE
7.	t030	II	Blood	III	<i>tst</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, RA
8.	t030	I	Nasal	III	<i>hla, sea</i>	FOX, SXT, GM, TE, RA
9.	t030	II	Nasal	IX	<i>hla</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
10.	t030	I	Nasal	V	-	FOX, GM
11.	t030	I	Blood	V	<i>pvl, hla, sea</i>	FOX, ERY, TE

فصل پنجم: نتیجه گیری پژوهش

12.	t030	IV	Wound	II	<i>hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, TE, RA
13.	t030	I	Trachea	II	<i>hla, tst</i>	FOX, ERY, TE
14.	t030	I	Urine	IX	<i>hla, tst</i>	FOX, ERY, CD
15.	t037	III	Urine	II	<i>hla, sec</i>	FOX, TE
16.	t037	I	Urine	III	<i>pvl, tst, hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
17.	t037	I	Nasal	III	<i>hla</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
18.	t037	III	Synovial	III	<i>hla</i>	FOX
19.	t037	II	Wound	III	<i>hla, sea</i>	FOX, TE
20.	t037	II	Nasal	IX	<i>pvl, tst, hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
21.	t037	I	Trachea	IX	<i>hla, sea</i>	FOX
22.	t037	I, II	Blood	IX	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
23.	t1258	II	Trachea	III	<i>tst, hla, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
24.	t1258	I	Trachea	I	<i>pvl, hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, TE, RA
25.	t1360	I, II	Wound	III	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, RA
26.	t1360	III	Wound	IX	<i>hla, sea, sec</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, RA
27.	t131	II	Wound	III	<i>pvl, hla, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
28.	t5163	II	Trachea	III	<i>pvl, hla, seb,</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE
29.	t5163	I	Wound	III	<i>hla</i>	FOX, ERY, CD, TE
30.	t7685	II	Urine	III	<i>tst, hla,</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
31.	t7685	III	Blood	III	<i>tst, hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM
32.	t1587	II	Nasal	III	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE
33.	t1403	II	Nasal	V	<i>tst, hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, SXT, GM
34.	t15871	II	Trachea	III	<i>pvl, hla</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE, RA
35.	t159	I	Trachea	III	<i>hla, sea, seb, sec</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE, RA
36.	t2104	II	Wound	III	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, TE, RA
37.	t275	II	Nasal	III	<i>pvl, hla</i>	FOX
38.	t223	II	Nasal	V	<i>tst, seb</i>	FOX, ERY, CD, TE
39.	t2457	II	Blood	III	<i>pvl, hly, seb</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE, RA
40.	t314	II	Wound	III	<i>hla,</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE, RA
41.	t2976	II	Urine	III	<i>pvl, tst, hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
42.	t3182	I	Blood	III	<i>pvl, tst, hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE, RA
43.	t3236	III	Nasal	III	<i>pvl, hla</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE

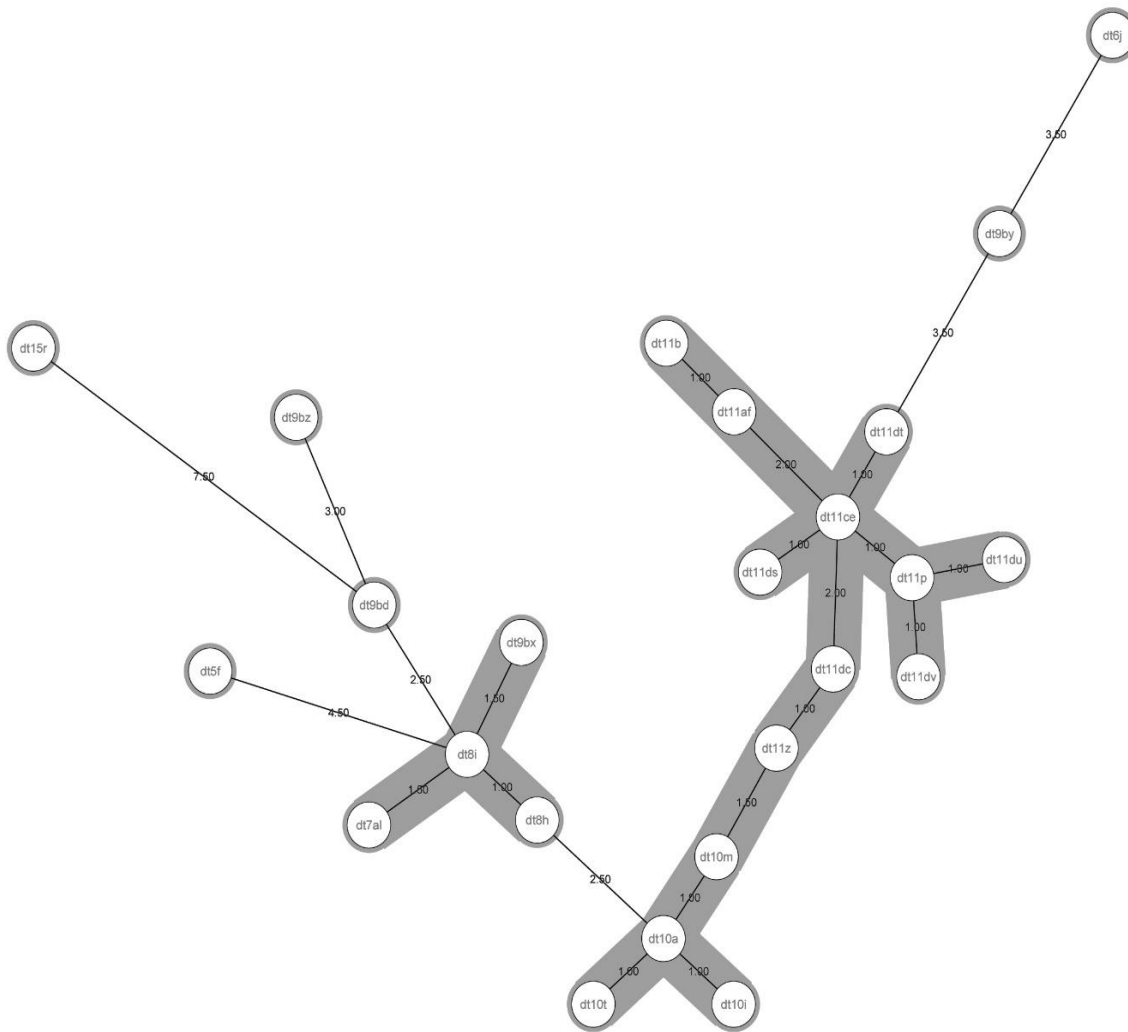
فصل پنجم: نتیجه‌گیری پژوهش

44.	t3204	II	Wound	II	<i>hla, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
45.	t3204	I	Nasal	III	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, GM
46.	t325	I	Trachea	III	<i>hla</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE, RA
47.	t325	II	Wound	III	<i>pvl, tst</i>	FOX, ERY, GM
48.	t325	IV	Wound	III	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE
49.	t4679	II	Nasal	III	<i>pvl, tst, hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, CD, GM, RA
50.	t3769	II	Synovial	I	<i>pvl, hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, RA
51.	t459	III	Blood	V	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, TE, RA
52.	t5593	II	Urine	IX	<i>hla</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
53.	t692	III	Nasal	III	<i>hla</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
54.	t790	II	Nasal		<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
55.	t459	II	Nasal	III	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, GM

یکی از تنظیم کننده‌های کلیدی استافیلوکوکوس اورئوس که در تنظیم فاکتورهای ویرولانسی باکتریایی نقش دارد، تنظیم کننده ژن کمکی (*agr*) است. تا به امروز، چهار نوع *agr* (I, II, III و IV) در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده است. در مطالعه حاضر، از بین ۵۵ ایزوله MRSA، نوع II با فراوانی ۵۴.۵ درصد تایپ غالب بود. در مطالعه قاسمیان و همکاران. [۳۳]، اکثر ایزوله‌ها (۶۹.۵٪) دارای *agr* I بودند و به دنبال آن نوع *agr* III (۳۰.۵٪) قرار داشتند. مطالعه گودرزی و همکاران. در ایران [۳۴] نشان داد که نوع *agr* III شایع‌ترین نوع ایزوله MRSA است (جدول ۵-۱). توزیع انواع *agr* بر اساس منطقه جغرافیایی متفاوت است.

dru تایپینگ یک روش مبتنی بر تعیین توالی با مزایایی از جمله هزینه کم نسبت به سایر روش‌های مشابه، سهولت عملکرد، تکرارپذیری بین آزمایشگاهی، عدم نیاز به سویه‌های مرجع و سهولت تجزیه و تحلیل توالی است. در نتیجه، ممکن است ابزار مفیدی برای تایپینگ ایزوله‌های MRSA باشد. در این مطالعه، بیست و چهار تایپ *dru* در ۵۵ ایزوله MRSA توالی‌یابی شده، شناسایی شدند که نشان‌دهنده تنوع بالایی در ناحیه *dru* می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که *dt8i* شایع‌ترین تایپ *dru* (۱۸.۲ درصد) بود. علاوه بر این، در ۵۵ ایزوله MRSA توالی‌یابی شده، دو کلاستر *dru*

(8i, 11ce) شناسایی شد. تجزیه و تحلیل MST دو خوشه اصلی *dru* را شناسایی کرد، که به عنوان خوشه های اصلی 8i و 11ce تعیین شدند، که dt8i و dt11ce گره‌های ریشه را تشکیل می‌دهند (شکل ۵-۱). کلاستر 8i شامل تایپ های dt8h، dt7al و dt9bx بود، در حالی که خوشه 11ce شامل سیزده تایپ مختلف بود. دو کلاستر، 8i و 11ce، مسئول ۸۳.۶ درصد از ایزوله های MRSA بودند. ویژگی های مهم مشخص شده تایپ های مختلف *dru* در ایزوله های MRSA در جدول ۵-۲ نشان داده شد. در مطالعه انجام شده توسط غزنوی راد و همکاران، *dru* تایپینگ تمایز خوبی بین ایزوله های SCCmec IIIa و III نشان داد [۴]. در این مطالعه، ۹ تایپ *dru*، SCCmec IIIa، هفت تایپ *dru* برای SCCmec III و dt13d در هر دو تایپ SCCmec مشاهده گردید. علاوه بر این، در مطالعه گورینگ و همکاران ۲۵ تایپ *dru* در اسکاتلند شناسایی شد که تایپهای dt10a و dt7c شایع‌ترین آنها بودند [۱۸].



شکل ۵-۱. نمودار MST از بیست و چهار تایپ *dru* شناسایی شده در ۵۵ ایزوله MRSA. مقادیر عددی روی شاخه‌ها شباهت (فاصله MST) بین انواع مختلف *dru* را نشان می‌دهد. نرم افزار BioNumerics مقادیر تشابه (bins) را ایجاد می‌کند و این داده‌ها را به واحدهای فاصله تبدیل می‌کند. فاصله واحدها بر روی ۰.۵ درصد تنظیم شد (یعنی تایپ‌های *dru* در فاصله ۱ در MST بین ۹۹ تا ۹۹.۵ درصد شباهت دارند، تایپ‌ها در فاصله ۲ بین ۹۸.۵ تا ۹۹ درصد شباهت دارند و غیره). اگر فاصله MST کمتر از ۲ (به عنوان مثال، اگر بیش از ۹۸.۵ درصد شباهت را نشان دهند) باشد تایپ‌های استافیلوکوکوس/اورئوس به یک خوشه اختصاص داده می‌شوند.

فصل پنجم: نتیجه‌گیری پژوهش

جدول ۵-۲. ویژگی‌های مهم مشخص شده تایپ‌های مختلف *dru* در ایزوله‌های MRSA

<i>dru</i> types	<i>dru</i> repeat	<i>dru</i> cluster	No. of isolates	SCCmec	Resistant genes	Virulence genes	Resistant profile
dt8i	5a-2d-3c-5b-3a-2g-3b-4e	8i	10	III/ II	<i>aac6/aph2, ermC</i>	<i>hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
dt8h	5a-2d-2d-5b-3a-2g-3b-4e	8i	4	III/V	<i>aac6/aph2, aph3, ermA, ermC</i>	<i>pvl, tst, hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, CD, RA, GM,
dt7al ^a	5a-2d-3c-5b-3a-2g-3b	8i	3	II/III	<i>aac6/aph2, ermA</i>	<i>hla, sea, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, TE, RA
dt9bz ^a	5a-2d-4a-3ad ^b - 2a-4c-3b-4e-3e	single	1	II	<i>aac6/aph2, ant4, ermA</i>	<i>tst, hla</i>	FOX, ERY, TE
dt9bd	5a-2d-4a-5b-3a-2g-3b-4e-3e	single	4	IX	<i>aac6/aph2, aph3, ant4, ermA, ermC</i>	<i>hla</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE, RA
dt15r	5a-1a-3c-5b-3a-5b-3a-2g-2b-5b-3a-2g-3n-4e-3e	single	1	III	<i>ermA, ermC</i>	<i>pvl, hla, sea, seb, sec</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
dt9by ^a	5a-2d-4a-0-2d-5b-4h-4e-3e	single	1	V	<i>ermC, ant4</i>	<i>pvl, hla, sea</i>	FOX, ERY, TE
dt6j	5a-2d-4a-0-2d-3e	single	1	III	<i>ermA, ermC</i>	<i>pvl, tst, hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
dt11dt ^a	5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-3o-2c-4e-3e	11ce	2	III	<i>aac6/aph2, ant4, ermB</i>	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, RA
dt11ce	5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-2g-2c-4e-3e	11ce	4	III	<i>aac6/aph2, aph3</i>	<i>hla</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
dt11ds ^a	5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-2g-2c-4e-2f	11ce	1	III	<i>aac6/aph2, ant4, ermA, ermC</i>	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
dt11z	5a-2d-3i-0-2d-5b-3a-2g-3b-4e-3e	11ce	2	III	<i>aac6/aph2, aph3, ermB</i>	<i>tst, hla, seb</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, TE
dt11af	5a-2d-4a-0-2d-5b-2a-2g-3b-4e-3e	11ce	1	III	<i>ermB, ermC</i>	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SYN, GM
dt11b	5a-2d-4a-0-2d-5b-2a-4c-3b-4e-3e	11ce	1	IX	<i>ant4, ermC</i>	<i>hla, sea, sec</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM, RA
dt11du ^a	5a-2d-4a-1b-2d-5b-3a-2g-2h-4e-3e	11ce	1	V	-	<i>hla</i>	FOX, TE
dt11p	5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-2g-2h-4e-3e	11ce	3	III/IX	<i>aac6/aph2, aph3, ermA, ermC</i>	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, RA

فصل پنجم: نتیجه‌گیری پژوهش

dt11dv^a	5a-2d-4a-0-2d-7a-3a-2g-2h-4e-3e	11ce	1	V	<i>ermA</i>	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, TE, RA
dt11dc	5a-2d-3i-0-2d-5b-3a-2g-6o-4e-3e	11ce	1	V	<i>ermC</i>	<i>tst, seb</i>	FOX, ERY, CD, TE,
dt10a	5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-2g-3b-4e	11ce	3	I/III	<i>ermA</i>	<i>hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, RA
dt10m	5a-2d-3i-0-2d-5b-3a-2g-3b-4e	11ce	5	III/II	-	<i>hla, tst, sea</i>	FOX, ERY, CD, SXT, GM
dt10t	5a-2d-4a-1b-2d-5b-3a-2g-3b-4e	11ce	1	I	<i>ermC</i>	<i>pvl, hla, sea</i>	FOX, ERY, CD, RA
dt10i	5a-2d-4a-0-2d-4f-3a-2g-3b-4e	11ce	1	III	-	<i>hla</i>	FOX
dt9bx^a	5a-2d-2d-1h ^b -5b-3a-2g-3b-4e	8i	2	III	<i>aac6/aph2, ant4, ermA, ermB</i>	<i>pvl, tst</i>	FOX, ERY, GM, RA
dt5f	9a-3a-2g-3b-4e	single	1	III	<i>aac6/aph2, ermC</i>	<i>pvl, hla, seb</i>	FOX, ERY, CD, GM, TE, RA

^a: novel *dru* types, detected for the first time within this study, ^b: novel *dru* repeat, detected for the first time within this study. FOX; Cefoxitin, ERY; Erythromycin, CD; Clindamycin, SXT; Trimethoprim/sulfamethoxazole, GM; Gentamicin, TE; Tetracycline, RA; Rifampin.

احتمالاً به دلیل اینکه بیمارستان الزهراى اصفهان یک بیمارستان مرجع بزرگ استان و سایر استان های همجوار است، بیماران زیادی به آن مراجعه می کنند و تنوع قابل توجهی در نمونه های بالینی وجود دارد. به همین دلیل تنوع تایپ های *dru* در این مطالعه (بیست و چهار تایپ *dru* در ۵۵ ایزوله MRSA) بیشتر از موارد گزارش شده در سایر مناطق می باشد. استراتژیهای مورد استفاده برای جلوگیری از گسترش سویه های MRSA نیازمند بررسی اطلاعات مربوط به گسترش و اپیدمیولوژی سویه های MRSA است. عفونت های بیمارستانی ایجاد شده با سویه های MRSA توسط یک گروه بسیار مهم پاتوژن های با مقاومت چند گانه به آنتی بیوتیک در سرتاسر جهان ایجاد شده و رد گیری و محدود کردن گسترش این سویه ها در داخل بخش های یک بیمارستان و یا بین بیمارستان ها نیازمند استفاده از

سیستم های تایپینگ سریع و صحیح است (۹۹). بنابراین شناسایی آنها جهت کنترل و ریشه کنی شیوع ناگهانی بسیار ضروری است.

۳-۵. نتیجه‌گیری

بررسی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنوع بالایی از سویه های *MRSA* در بیمارستانهای ایران وجود دارد که نشان دهنده دینامیک فعال سویه های استافیلوککی و کلونیزاسیون از طریق منابع مختلف در محیط بیمارستان می‌باشد. پیدایش تیپ‌های جدید و نوظهور *MRSA* با مقاومت چندگانه به آنتی بیوتیک ها که بعضا حامل ژن *pvl* هستند می‌تواند هشدار جدی برای پزشکان و پرسنل کنترل عفونت باشد. حضور کلونهای با زمینه ژنتیکی *CA-MRSA* و تطابق آنها با محیط بیمارستان با توجه به قدرت و ویرولانسی بالایشان میتواند زمینه ساز کلونیزاسیون و گسترش عفونتهای ناشی از آن، افزایش هزینه ها و مرگ و میر ناشی از عفونتهای بیمارستانی شوند. وجود این کلون‌های رایج و کلاسترهای *dru* در مطالعات اخیر نشان می‌دهد که این کلاسترها و تایپ های *SCCmec* به طور فعال در محیط‌های بهداشتی و درمانی ایران در حال گردش هستند. اگرچه تنوع تایپ های *dru* در این مطالعه بالا بود (۲۴/۵۵)، اما اکثر این تایپ ها به عنوان دو کلاستر (*8i, 11ce*) طبقه‌بندی می‌شوند و از نظر فیلوژنتیکی مرتبط هستند. مطالعه حاضر بر اهمیت تایپینگ مولکولی در ردیابی روندهای جهانی در ظهور، گسترش و تداوم سویه های اپیدمی *MRSA* تاکید می‌کند.

۴-۵. پیشنهادهای حاصل از پژوهش

- ۱- انجام غربالگری مداوم پرسنل و بیماران از نظر کلونیزاسیون با استافیلوکوکوس اورئوس
- ۲- بررسی اپیدمیولوژیک با روشهای مولکولی بصورت دوره‌ای در بیمارستان‌ها جهت تعیین ویژگیهای سویه‌های در گردش بیمارستانها
- ۳- لزوم اجرای دستورالعمل‌های بهتر کنترل عفونت در بیمارستان‌ها، و همچنین مطالعات نظارتی اپیدمیولوژیک، می‌تواند قویاً برای پیشگیری مؤثر از گسترش باکتری به بیماران بستری پیشنهاد شود.
- ۴- لزوم آگاه‌سازی و فرهنگ‌سازی در خصوص مصرف بی‌رویه و بدون نسخه آنتی‌بیوتیک‌ها
- ۵- به روز رسانی شیوه‌های کنترل عفونت در بیمارستان‌ها

منابع

1. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(9):1265-73.
2. El Atrouni WI, Knoll BM, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Sia IG, Baddour LM. Temporal trends in the incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia in Olmsted County, Minnesota, 1998 to 2005: a population-based study. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(12):e130-e8.
3. Rhee Y, Aroutcheva A, Hota B, Weinstein RA, Popovich KJ. Evolving epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *infection control & hospital epidemiology*. 2015;36(12):1417-22.
4. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):603-61.
5. Souli M, Ruffin F, Choi S-H, Park LP, Gao S, Lent NC, et al. Changing characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteremia: results from a 21-year, prospective, longitudinal study. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;69(11):1868-77.
6. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Annals of internal medicine*. 2002;137(10):791-7.
7. Jensen AG, Wachmann CH, Poulsen KB, Espersen F, Scheibel J, Skinhøj P, et al. Risk factors for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Archives of internal medicine*. 1999;159(13):1437-44.
8. Chambers HF, Korzeniowski OM, Sande MA. *Staphylococcus aureus* endocarditis: clinical manifestations in addicts and nonaddicts. *Medicine*. 1983;62(3):170-7.
9. Quagliarello B, Cespedes C, Miller M, Toro A, Vavagiakis P, Klein RS, et al. Strains of *Staphylococcus aureus* obtained from drug-use networks are closely linked. *Clinical infectious diseases*. 2002;35(6):671-7.
10. Laupland KB, Lyytikäinen O, Sgaard M, Kennedy K, Knudsen JD, Ostergaard C, et al. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clinical microbiology and infection*. 2013;19(5):465-71.
11. Wiese L, Mejer N, Schönheyder HC, Westh H, Jensen A, Larsen A, et al. A nationwide study of comorbidity and risk of reinfection after *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Infection*. 2013;67(3):199-205.
12. Inagaki K, Lucar J, Blackshear C, Hobbs CV. Methicillin-susceptible and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Nationwide Estimates of 30-Day Readmission, In-hospital Mortality, Length of Stay, and Cost in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;69(12):2112-8.
13. Mylotte JM, McDermott C, Spooner JA. Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Reviews of infectious diseases*. 1987;9(5):891-907.

14. Shurland S, Zhan M, Bradham DD, Roghmann M-C. Comparison of mortality risk associated with bacteremia due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2007;28(3):273-9.
15. Van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(2):362-86.
16. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of clinical pathology*. 1961;14(4):385.
17. Benner EJ, Kayser F. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. 1968;292(7571):741-4.
18. System NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 2004;32:470-85.
19. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama*. 2007;298(15):1763-71.
20. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, de Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and-resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(17):9865-70.
21. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(11):7687-92.
22. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science*. 1993;259(5092):227-30.
23. Archer GL, Niemeyer DM, Thanassi JA, Pucci MJ. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994;38(3):447-54.
24. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(7):2637-51.
25. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microbial Drug Resistance*. 2001;7(4):349-61.
26. Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.
27. Becker K, Denis O, Roisin S, Mellmann A, Idelevich EA, Knaack D, et al. Detection of *mecA*- and *mecC*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates by the new Xpert MRSA Gen 3 PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(1):180-4.
28. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(3):512-30.

29. Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(12):5578-81.
30. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*. 1998;339(8):520-32.
31. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama*. 2003;290(22):2976-84.
32. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*. 2011;60(2):95-103.
33. Štěpán J, Pantůček R, Doškař J. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia microbiologica*. 2004;49(4):353-86.
34. Bibalan MH, Shakeri F, Javid N, Ghaemi A, Ghaemi EA. Accessory gene regulator types of *Staphylococcus aureus* isolated in Gorgan, North of Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2014;8(4):DC07.
35. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(9):629-41.
36. Goering RV, Morrison D, Al-Doori Z, Edwards G, Gemmell C. Usefulness of mec-associated direct repeat unit (dru) typing in the epidemiological analysis of highly clonal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Scotland. *Clinical microbiology and infection*. 2008;14(10):964-9.
37. Kadlec K, Schwarz S, Goering RV, Weese JS. Direct repeat unit (dru) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and cats. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(12):3760-5.
38. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Demelio V, Spina D, Nicoletti G, et al. agr-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007;51(1):220-7.
39. Khoramrooz SS, Mansouri F, Marashifard M, Hosseini SAAM, Chenarestane-Olia FA, Ganavehei B, et al. Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microbial pathogenesis*. 2016;97:45-51.
40. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2014;6:PMC. S14459.
41. Boswihi SS, Udo EE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Current Medicine Research and Practice*. 2018;8(1):18-24.
42. Dadashi M, Nasiri MJ, Fallah F, Owlia P, Hajikhani B, Emaneini M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2018;12:96-103.
43. Franklin D Lowy. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): *Microbiology* [last updated: Jun 04, 2019] 2020 [Available from: https://www.uptodate.com/contents/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa-microbiology?search=Staphylococcus%20aureus&source=search_result&selectedTitle=9~150&usage_type=default&display_rank=9].
44. Anderson DJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in adults: *Epidemiology* [last updated: Mar 26, 2019] 2020 [Available from: <https://www.uptodate.com/contents/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa>].

[in-adults-epidemiology?search=Staphylococcus%20aureus&source=search_result&selectedTitle=10~150&usage_type=default&display_rank=10.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711111)

45. Boyce JM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology, and preventive measures. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 1992;13(12):725-37.
46. Shakeri F, Shojai A, Golalipour M, Rahimi Alang S, Vaez H, Ghaemi EA. Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. *International journal of microbiology*. 2010;2010.
47. Sakoulas G. The accessory gene regulator (*agr*) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role in virulence and reduced susceptibility to glycopeptide antibiotics. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2006;3(2):287-94.
48. Fattom AI, Horwith G, Fuller S, Propst M, Naso R. Development of StaphVAX™, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. *Vaccine*. 2004;22(7):880-7.
49. Wienders C, Fluit A, Brisse S, Verhoef J, Schmitz F. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(11):3970-5.
50. Shinefield H, Black S, Fattom A, Horwith G, Rasgon S, Ordonez J, et al. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(7):491-6.
51. Wikler MA. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI (NCCLS). 2006;26:M7-A.
52. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*. 2003;36(1):53-9.
53. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases*. 2004;39(3):309-17.
54. Anderson DJ, Sexton DJ, Kanafani ZA, Auten G, Kaye KS. Severe surgical site infection in community hospitals: epidemiology, key procedures, and the changing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection control and hospital epidemiology*. 2007;28(9):1047-53.
55. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection control and hospital epidemiology*. 2008;29(11):996-1011.
56. Control CfD, Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. *Am J Infect Control*. 2003;31:481-98.
57. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahn DF. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2006;5(1):2.

58. Kourtis AP, Hatfield K, Baggs J, Mu Y, See I, Epton E, et al. Vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections—United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2019;68(9):214.
59. Jones M, Jernigan JA, Evans ME, Roselle GA, Hatfield KM, Samore MH. Vital signs: trends in *Staphylococcus aureus* infections in Veterans Affairs medical centers—United States, 2005–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2019;68(9):220.
60. Sader HS, Streit J, Fritsche T, Jones R. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002–2004). *Clinical microbiology and infection*. 2006;12(9):844-52.
61. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl V, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1994;13(1):50-5.
62. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(Supplement_3):S171-S6.
63. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(14):1436-44.
64. Boyce J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Detection, epidemiology, and control measures. *Infectious disease clinics of North America*. 1989;3(4):901.
65. Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(6):776-82.
66. THOMPSON RL, CABEZUDO I, WENZEL RP. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Internal Medicine*. 1982;97(3):309-17.
67. Abramson MA, Sexton DJ. Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: at what costs? *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1999;20(6):408-11.
68. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archives of internal medicine*. 2002;162(19):2229-35.
69. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2005;26(2):166-74.
70. Reed SD, Friedman JY, Engemann JJ, Griffiths RI, Anstrom KJ, Kaye KS, et al. Costs and outcomes among hemodialysis-dependent patients with methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infection control and hospital epidemiology*. 2005;26(2):175-83.
71. Whitby M, McLaws ML, Berry G. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Medical Journal of Australia*. 2001;175(5):264-7.
72. Diep BA, Chambers HF, Graber CJ, Szumowski JD, Miller LG, Han LL, et al. Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant

Staphylococcus aureus clone USA300 in men who have sex with men. *Annals of internal medicine*. 2008;148(4):249-57.

73. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. 2006;367(9512):731-9.

74. SARAVOLATZ LD, MARKOWITZ N, ARKING L, POHLOD D, FISHER E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. *Annals of Internal Medicine*. 1982;96(1):11-6.

75. Hersh AL, Chambers HF, Maselli JH, Gonzales R. National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft-tissue infections. *Archives of internal medicine*. 2008;168(14):1585-91.

76. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(7):666-74.

77. Miller LG, Eells SJ, Taylor AR, David MZ, Ortiz N, Zychowski D, et al. *Staphylococcus aureus* colonization among household contacts of patients with skin infections: risk factors, strain discordance, and complex ecology. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;54(11):1523-35.

78. Campbell KM, Vaughn AF, Russell KL, Smith B, Jimenez DL, Barrozo CP, et al. Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an outbreak of disease among military trainees in San Diego, California, in 2002. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(9):4050-3.

79. Karanika S, Kinamon T, Grigoras C, Mylonakis E. Colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and risk for infection among asymptomatic athletes: a systematic review and metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(2):195-204.

80. Tattevin P, Schwartz BS, Graber CJ, Volinski J, Bhukhen A, Bhukhen A, et al. Concurrent epidemics of skin and soft tissue infection and bloodstream infection due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases*. 2012;55(6):781-8.

81. Baptiste KE, Williams K, Williams NJ, Wattret A, Clegg PD, Dawson S, et al. Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(12):1942.

82. Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS, Smith K, Johnson S, Boxrud D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *Jama*. 2001;286(10):1201-5.

83. Jackson KA, Bohm MK, Brooks JT, Asher A, Nadle J, Bamberg WM, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among persons who inject drugs—six sites, 2005–2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2018;67(22):625.

84. Sing A, Tuschak C, Hörmansdorfer S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(11):1200-1.

85. Wardyn SE, Forshey BM, Farina SA, Kates AE, Nair R, Quick MK, et al. Swine farming is a risk factor for infection with and high prevalence of carriage of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases*. 2015;61(1):59-66.

86. Miller LG, Remington FP, Bayer AS, Diep B, Tan N, Bharadwa K, et al. Clinical and epidemiologic characteristics cannot distinguish community-associated methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* infection from methicillin-susceptible *S. aureus* infection: a prospective investigation. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;44(4):471-82.
87. Gillet Y, Vanhems P, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Floret D, et al. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(3):315-21.
 88. Stankovic C, Mahajan PV, Asmar BI. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of community-acquired pneumonia. *Current Infectious Disease Reports*. 2007;9(3):223-7.
 89. Vayalunkal JV, Whittingham H, Vanderkooi O, Stewart TE, Low DE, Mulvey M, et al. Necrotizing pneumonia and septic shock: suspecting CA-MRSA in patients presenting to Canadian emergency departments. *Canadian Journal of Emergency Medicine*. 2007;9(4):300-3.
 90. Bancroft EA. Antimicrobial resistance: it's not just for hospitals. *Jama*. 2007;298(15):1803-4.
 91. Calfee DP, Durbin LJ, Germanson TP, Toney DM, Smith EB, Farr BM. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2003;24(6):422-6.
 92. David MZ, Glikman D, Crawford SE, Peng J, King KJ, Hostetler MA, et al. What is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(9):1235-43.
 93. Popovich KJ, Snitkin ES, Hota B, Green SJ, Pirani A, Aroutcheva A, et al. Genomic and epidemiological evidence for community origins of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(11):1640-7.
 94. Huang SS, Platt R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(3):281-5.
 95. Davis S, Perri M, Donabedian S, Manierski C, Singh A, Vager D, et al. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(6):1705-11.
 96. Otter JA, French GL. Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *The Lancet infectious diseases*. 2006;6(12):753-5.
 97. Maree CL, Daum RS, Boyle-Vavra S, Matayoshi K, Miller LG. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and healthcare-associated infections. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(2):236.
 98. Mertz D, Frei R, Periat N, Zimmerli M, Battagay M, Flückiger U, et al. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Archives of Internal Medicine*. 2009;169(2):172-8.
 99. Suffoletto BP, Cannon EH, Ilkhanipour K, Yealy DM. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in emergency department personnel. *Annals of emergency medicine*. 2008;52(5):529-33.
 100. Williamson K, Bisaga A, Paquette K, Lovell E. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in emergency department fast track patients. *World journal of emergency medicine*. 2013;4(4):278.

101. MacDougall C, Powell JP, Johnson CK, Edmond MB, Polk RE. Hospital and community fluoroquinolone use and resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in 17 US hospitals. *Clinical infectious diseases*. 2005;41(4):435-40.
102. Schneider-Lindner V, Delaney J, Dial S, Dascal A, Suissa S. Antimicrobial drugs and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United Kingdom. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(7):994.
103. Mathews WC, Caperna JC, Barber RE, Torriani FJ, Miller LG, May S, et al. Incidence of and risk factors for clinically significant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a cohort of HIV-infected adults. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2005;40(2):155-60.
104. Nguyen DB, Lessa FC, Belflower R, Mu Y, Wise M, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among patients on chronic dialysis in the United States, 2005–2011. *Clinical infectious diseases*. 2013;57(10):1393-400.
105. Spindel SJ, Strausbaugh LJ, Jacobson C. Infections caused by *Staphylococcus aureus* in a Veterans' Affairs nursing home care unit: a 5-year experience. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 1995;16(4):217-23.
106. Ing M, Baddour L, Bayer A. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. *The staphylococci in human disease* Churchill Livingstone, New York, NY. 1997:331-54.
107. Forsblom E, Ruotsalainen E, Ollgren J, Järvinen A. Telephone consultation cannot replace bedside infectious disease consultation in the management of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases*. 2013;56(4):527-35.
108. Jenkins TC, Price CS, Sabel AL, Mehler PS, Burman WJ. Impact of routine infectious diseases service consultation on the evaluation, management, and outcomes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases*. 2008;46(7):1000-8.
109. Rieg S, Peyerl-Hoffmann G, de With K, Theilacker C, Wagner D, Hübner J, et al. Mortality of *Staphylococcus aureus* bacteremia and infectious diseases specialist consultation: a study of 521 patients in Germany. *J Infect*. 2009;59:232-9.
110. Vance G, Fowler J, Thomas L, Holland TL. Clinical approach to *Staphylococcus aureus* bacteremia in adults [last updated: Feb 13, 2020]: UpToDate; 2020 [Available from: https://www.lib.utdo.ir/contents/clinical-approach-to-staphylococcus-aureus-bacteremia-in-adults?search=Staphylococcus%20aureus&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1].
111. Holland TL, Arnold C, Fowler VG. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *Jama*. 2014;312(13):1330-41.
112. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical infectious diseases*. 2011;52(3):e18-e55.
113. Fowler VG, Li J, Corey GR, Boley J, Marr KA, Gopal AK, et al. Role of Echocardiography in Evaluation of Patients With *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Experience in 103 Patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;30(4):1072-8.
114. López-Cortés LE, del Toro MD, Gálvez-Acebal J, Bereciartua-Bastarrica E, Fariñas MC, Sanz-Franco M, et al. Impact of an evidence-based bundle intervention in the quality-of-care management and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*. 2013;57(9):1225-33.

115. Sutherland R, Croydon E, Rolinson G. Flucloxacillin, a new isoxazolyl penicillin, compared with oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. *Br Med J.* 1970;4(5733):455-60.
116. Nissen JL, Skov R, Knudsen JD, Østergaard C, Schønheyder HC, Frimodt-Møller N, et al. Effectiveness of penicillin, dicloxacillin and cefuroxime for penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a retrospective, propensity-score-adjusted case-control and cohort analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2013;68(8):1894-900.
117. Kriegeskorte A, Idelevich EA, Schlattmann A, Layer F, Strommenger B, Denis O, et al. Comparison of different phenotypic approaches to screen and detect *mecC*-harboring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology.* 2018;56(1).
118. Eveillard M, de Lassence A, Lancien E, Barnaud G, Ricard J-D, Joly-Guillou M-L. Evaluation of a strategy of screening multiple anatomical sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to a teaching hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology.* 2006;27(2):181-4.
119. Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases.* 1994;19(6):1123-8.
120. Inglis B, Matthews P, Stewart P. The expression in *Staphylococcus aureus* of cloned DNA encoding methicillin resistance. *Microbiology.* 1988;134(6):1465-9.
121. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K-i, Oguchi A, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet.* 2002;359(9320):1819-27.
122. Zhang H, Hackbarth C, Chansky K, Chambers H. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. *Science.* 2001;291(5510):1962-5.
123. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology.* 1984;158(2):513-6.
124. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1985;28(3):397-403.
125. de Jonge BL, Tomasz A. Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillin-binding protein 2A in cell wall synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1993;37(2):342-6.
126. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, et al. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the *agr* quorum sensing system. *Journal of Infectious Diseases.* 2012;205(5):798-806.
127. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2002;46(4):1147-52.
128. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases.* 2011;11(8):595-603.

129. van Cleef BA, Monnet DL, Voss A, Krziwanek K, Allerberger F, Struelens M, et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(3):502.
130. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(11):5113-20.
131. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(11):1495-503.
132. King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova EV, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Annals of internal medicine*. 2006;144(5):309-17.
133. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB, et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(1):108-18.
134. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(10):4352-9.
135. Wu S, PISCITELLI C, de LENCASTRE H, TOMASZ A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*. 1996;2(4):435-41.
136. Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, et al. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(14):5883-8.
137. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of bacteriology*. 2005;187(7):2426-38.
138. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. 1998;6(12):484-8.
139. Foster TJ HMSpaoSaTMD-.
140. Trindade P, McCulloch J, Oliveira G, Mamizuka E. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2003;7(1):32-43.
141. Abiri P AsA, Goudarzi M. Molecular analysis and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients. *Research in Medicine*. 2018;42(3):167-75.
142. Ho C-M, Ho M-W, Li C-Y, Lu J-J. Fine typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates using direct repeat unit and staphylococcal interspersed repeat unit typing methods. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2015;48(4):370-5.

143. Sedaghat H, Esfahani BN, Halaji M, Jazi AS, Mobasherizadeh S, Havaei SR, et al. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains from a teaching hospital in Isfahan, Iran: The emergence of MRSA ST639-SCCmec III and ST343-SCCmec III. *Iranian journal of microbiology*. 2018;10(2):82.
144. EBADI M, Khaliliazad T. Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy workers nasal swabs in Larestan hospitals. 2018.
145. Fasihi Y, Fooladi S, Mohammadi MA, Emaneini M, Kalantar-Neyestanaki D. The spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates by High Resolution Melting (HRM) analysis. *Journal of medical microbiology*. 2017;66(9):1335-7.
146. Mahmoudi Mourderaz Y, Chaman R, Malekhosseini A, Sharifi A, Khosravani S, Taher Rezanejad M, et al. Antimicrobial resistance pattern and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carrier personnel in Shahid Beheshti Hospital in Yasuj city. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*. 2017;25(113):91-102.
147. Khan S, Rasheed F, Zahra R. Genetic Polymorphism of agr Locus and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* at two hospitals in Pakistan. *Pakistan journal of medical sciences*. 2014;30(1):172.
148. Hu L, Li Y, Lu Y, Klena J, Qiu Y, Lin Y, et al. Clinical characteristics, virulence factors and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Shenzhen City, China. *Epidemiology & Infection*. 2016;144(14):3037-45.
149. Rodriguez M, Hogan PG, Satola SW, Crispell E, Wylie T, Gao H, et al. Discriminatory indices of typing methods for epidemiologic analysis of contemporary *Staphylococcus aureus* strains. *Medicine*. 2015;94(37).

Abstract

Abstract

The changing epidemiology and decreasing susceptibility to first-line antibiotics, such as vancomycin and linezolid, leave clinicians with few therapeutic options for MRSA infections. This study aimed to conduct an epidemiology study and characterize MRSA isolates. A total of 150 MRSA isolates were collected from clinical specimens. Antimicrobial susceptibility was determined using the disk diffusion method. Resistance and major virulence genes were screened using the polymerase chain reaction. The SCCmec and *dru* typing were used to conduct molecular epidemiology. The BioNumerics tandem-repeat sequence typing (TRST) plug-in tool was utilized for *dru* type cluster analysis. We constructed a minimum spanning tree (MST) using the similarity matrix of the DSI model. We discovered 24 *dru* types among the 55 *dru* sequenced MRSA isolates. Additionally, eight new *dru* types were discovered and added to the *dru* typing database. Two *dru* clusters (8i, 11ce) and nine single *dru* types were identified in 55 *dru* sequenced MRSA isolates. The two *dru* clusters, 8i and 11ce, accounted for 46 MRSA isolates (83.63 percent). The most common one of the nine singles *dru* types in this study was dt9bd, which belonged to the SCCmec types of IX. Given that two clusters account for the majority of strains in our study, we can conclude that the genetic origin of these strains is the same. Therefore, the spread of these strains can be prevented with effective MRSA monitoring in hospitals and communities.

Keywords: MRSA; *Staphylococcus aureus*; Genotyping; Microbial Drug Resistance, Molecular epidemiology



Shahed University
Faculty of Medicine, Department of Microbiology

Title

**Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains
Isolated from Inpatient and Outpatient Specimens of Alzahra Teaching Hospital in
Isfahan Using *Agr, Spa, Dru Methods* in 2019**

By

Latifpour, Mohammad

Supervisor

Mohammad, Niakan, Ph.D.

Advisor

Narimani, Tahmineh, Ph.D.

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Ph. D.
of medical bacteriology

Summer 2022

