شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد انتروتوکسین A در بیمارستانهای تهران

فاتح رحیمی[۱]، مجید بوذری[۲*]، محمد کتولی[۳]، محمد رضا پورشفیع[۴]

۱. دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲. دکترای تخصصی ویروس شناسی، دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۳. دکترای تخصص باکتری شناسی، استاد دانشکده علوم، بهداشت و آموزش، دانشگاه سان شاین کوست استرالیا
۴. دکترای تخصص باکتری شناسی، استاد بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران

*** نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، bouzari@sci.ui.ac.ir
دریافت مقاله: آذر نود و دو پذیرش برای چاپ: بهمن نود و دو

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس باکتری بیماری‌زای بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که واجد طیف وسیعی از باکتری-خوارها و عوامل حدت است. این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین فراوانی ژن انتروتوکسین A در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از ۲ بیمارستان در تهران به انجام رسیده است.*

روش کار: *در مجموع ۹۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با استفاده از پرایمر اختصاصی تا حد گونه شناسایی شدند. حساسیت جدایه‌ها نسبت به ۱۷ آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن و هم چنین حداقل غلظت مهار کننده آنها نسبت به آنتی بیوتیکهای اگزاسیلین و ونکومایسین به روش Etest تعیین گردید. حضور ژنهایmecA و seaدر میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از آزمون PCR بررسی شد. وجود پروفاژهای مختلف در جدایه‌های مقاوم به متی‌سلین با آزمون Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۶ دسته پروفاژی تعیین گردید.*

یافته ها: *بیش ترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک های پنی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، کاناماسین، آمیکاسین،توبرامایسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین مشاهده گردید. پنج پروفاژ تایپ مختلف در میان جدایه‌ها شناسایی گردید و تمامی جدایه‌ها واجد حداقل ۱ پروفاژ تایپ بودند. ژن های mecA و seaدر ۱۰۰ درصد سویه ها شناسایی شدند.*

نتیجه گیری: *وجود پروفاژهایی از دسته‌های مختلف، تولید انتروتوکسین A و مقاومت بالای جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به بسیاری از داروهای معمول خطوط اول و دوم درمانی می‌تواند یک تهدید بالقوه برای سلامت عمومی و بهداشت جامعه باشد.*

واژگان کلیدی: ***استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، پروفاژ، انتروتوکسین A***

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبتی است که در همه جا یافت می شود. این باکتری در انسان و دام های اهلی کلنیزه می شود و یک بیماری زای فرصت طلب محسوب می شود. تخمین زده می شود که استافیلوکوکوس اورئوس در ۲۰ درصد از جمعیت به صورت پایدار وجود داشته باشد، این در حالی است که ۶۰ درصد دیگر از جمعیت نیز به عنوان ناقلین متناوب این باکتری در نظر گرفته می شوند(۱). اغلب مجاری قدامی بینی جایگاه های کلنیزه شدن این باکتری می باشند، و این کلنیزه شدن باعث افزایش خطر ابتلا به عفونتهای استافیلوکوکوسی در زمان صدمه دیدن سیستمهای دفاعی میزبان می شود. این امر با مشاهدات مختلفی پشتیبانی می شود. به عنوان مثال، فراوانی عفونتها در ناقلین بسیار بیشتر از افراد غیرناقل است(۲). افراد سالم و غیرناقل، عموما از طریق غذاهای آلوده و یا زمانی که گرداننده های مواد غذائی که ناقل این باکتری می - باشند و در زمان تهیه مواد غذائی باعث آلودگی آنها می شوند، مبتلا به عفونتهای استافیلوکوکوسی می شوند(۳).

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس طیف وسیعی از عوامل مرتبط با سلول و همچنین عوامل حدت ترشحی را بیان می کند. این خصوصیتها، استافیلوکوکوس اورئوس را مبدل به یک باکتری بیماری زای همه کاره با قابلیت ایجاد طیف گسترده ای از عفونتها می کند. عوامل ترشحی مشتمل بر آنزیمهای مختلف، سایتوتوکوسین، اگزوتوکسین و اکسفولیاتیو توکسین هستند. عملکرد اصلی این آنزیمها تبدیل اعضاء و اجزاء میزبان به مواد غذائی مورد نیاز برای رشد و تکثیر باکتریها است. از دیگر عوامل ترشحی می توان به اگزوتوکسینهای خارجی اشاره نمود که مشتمل بر انتروتوکسینهای استافیلوکوکوسی و سم-۱ سندرم شوک سمی است. این عوامل باعث دگرگونی سیستم ایمنی شده و پاسخهای اصلی سیستم دفاعی میزبان را مهار می کنند(۴).

انتروتوکسینهای استافیلوکوکوسی متعلق به خانواده ای از اگزوتوکسینهای استافیلوکوکوسی و استرپتوکوکوسی با بیش از بیست عضو هستند که از نظر عملکردی با یکدیگر مرتبط بوده و دارای همسانی و شباهت توالی می باشند(۳). نشان داده شده است که این پروتئینهای باکتریایی، تب زا هستند و عامل ایجاد بیماریهای انسانی شاخصی از قبیل مسمومیتهای غذائی و سندرم شوک سمی به شمار می روند. این سموم بیشتر توسط گونه استافیلوکوکوس اورئوس تولید می شوند، در حالی که مشخص شده است که سایر گونه های استافیلوکوکوس نیز می توانند در تولید این سموم نقش داشته باشند(۵).

بیشتر ژنهای رمز کننده، اغلب بر روی عناصر ژنتیکی متحرکی مانند دیسکها، ترانسپوزونها و جزایر بیماری‌زائی واقع شده‌اند. بنابراین، انتقال افقی ژن در میان جدایه‌ها نادر و کمیاب نیست(۶). با وجود اینکه بیش از بیست ژن مربوط به انتروتوکسینهای استافیلوکوکوسی تا کنون شناسائی شده است، اما با این وجود تعداد کمی از آنها به تفصیل مورد مطالعه قرار گرفته اند(۷). انتروتوکسینهای A و B به عنوان شایعترین انتروتوکسینها شناخته می شوند. انتروتوکسینAشایعترین و بیشترین انتروتوکسین مرتبط با مسمومیت‌های غذائی ناشی از استافیلوکوکوس‌ها به شمار می‌رود(۳). ژن رمز کننده انتروتوکسین A استافیلوکوکوسی (sea) توسط یک باکتری‌خوار معتدل(SGF) حمل می‌شود(۸). به نظر می‌رسد که حدت در استافیلوکوکوس اورئوس چند عاملی است و ناشی از ترکیب عملکرد شاخصهای حدت متعددی می باشد. در این میان یک استثناء مربوط به جدایه‌های مولد سم است، مانند سندرم شوک سمی، سندرم پوست پوسته شونده استافیلوکوکوسی و مسمومیت غذایی استافیلوکوکوسی که به ترتیب توسط سم سندرم شوک سمی، سمهای اکسفولیاتیو A و B و انتروتوکسینهای مختلف ایجاد می شوند(۹).

این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین فراوانی ژن انتروتوکسین A در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از ۲ بیمارستان در تهران به انجام رسیده است.

روش کار

در این مطالعه در طی سالهای ۱۳۹۰-۱۳۸۹ در مجموع ۳۷۹ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از دو بیمارستان در شهر تهران جدا گردید. به این ترتیب که ۲۰۸ جدایه (۵۵٪) از بیمارستان A و ۱۷۱ جدایه (۴۵٪) نیز از بیمارستان B به دست آمد. در آزمایشگاه بخش میکروبشناسی انستیتو پاستور ایران تمامی ایزوله ها در ابتدا با استفاده از آزمون های رنگ آمیزی گرم، کواگولاز و DNase و تخمیر قند مانیتول بررسی و تأیید شدند(۱۰).

پس از شناسائی اولیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت این سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک اگزاسیلین (۱ میکروگرم) (MAST Group, Merseyside, United Kingdom)، به روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) تعیین گردید(۱۱). حساسیت آنتی-بیوتیکی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اگزاسیلین به روش دیسک دیفیوژن و بر اساس استانداردهای CLSI نسبت به ۱۷ آنتی بیوتیک و با استفاده از محیط Muller Hinton Agar (Merck, Darmstadt, Germany) واجد ۴٪ نمک بررسی شد(۱۱). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی‌آمیکاسین (۱۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین G (۱۰ واحد)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپیسین (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سینرسید (۱۵ میکروگرم)، فوزیدیک اسید (۱۰ میکروگرم)، کانامایسین (۱۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، لینزولید (۳۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم) و نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم) از شرکت MAST (Merseyside, United Kingdom) تهیه شدند.

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک های ونکومایسین و اگزاسیلین از روش Etest (AB bioMerieux, Solna, Sweden) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد و تفسیر نتایج بر اساس استانداردهای CLSI انجام گرفت(۱۱).

جهت استخراج DNA برای انجام آزمون های مولکولی، کیت High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده و با اندکی تغییرات استفاده شد.

از DNA استخراج شده به عنوان الگو جهت انجام آزمون PCR و برای شناسایی سویه ها در حد گونه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (ژن nuc) استفاده شد. جهت انجام این آزمون از پرایمرهای طراحی شده و ترکیب مواد و برنامه PCR ارائه شده توسطZouharovaو همکاران(۱۲) استفاده شد.

جهت تشخیص وجود ژن mecA در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس که به روش های دیسک دیفیوژن و Etest به عنوان جدایه های مقاوم به متی سیلین شناسایی شدند از آزمون PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده و همچنین برنامه PCR و ترکیب مواد ارائه شده توسط McClure و همکاران استفاده شد(۱۳).

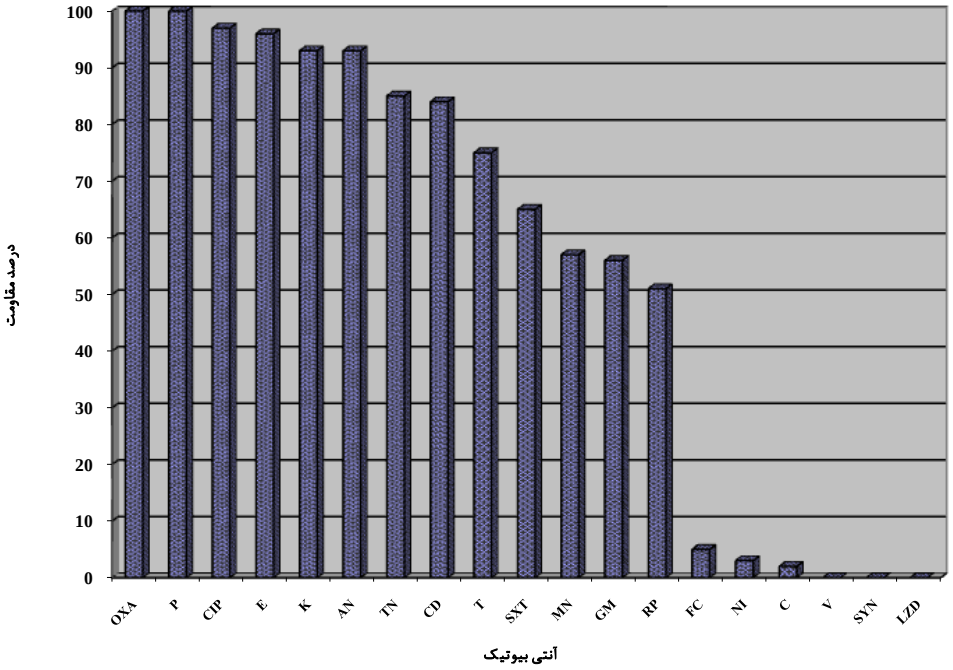
جهت پروفاژ تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی - سیلین از آزمون Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مختلف برای هر یک از دسته های پروفاژی استفاده گردید. برای این منظور از ۷ جفت پرایمر اختصاصی که توسط Pantucek و همکاران طراحی گردید(۱۴)، و همچنین برنامه و ترکیب مواد با اندکی تغییر استفاده شد که پیشتر به آن اشاره گردید(۱۵, ۱۶).

جهت شناسایی وجود ژنseaرمزکننده انتروتوکسینA در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از آزمون PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژنsea که توسط Zouharova و همکاران طراحی گردید، استفاده شد(۱۲). تکثیر ژنsea با مخلوط واکنش PCRو با استفاده از چرخه حرارتی طراحی شده توسط Zouharova و همکاران انجام گرفت.

یافته ها

تمامی ۳۷۹ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از آزمونهای فنوتیپی تأیید شدند. همچنین با استفاده از آزمون دیسک دیفیوژن ۹۴ سویه (۲۴/۸ درصد) به عنوان سویه های مقاوم به متی سیلین جهت انجام بررسی های بیشتر انتخاب گردیدند. نتایج آزمون PCR با استفاده پرایمرهای اختصاصی ژن nuc، صحت شناسایی ۹۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس را تأیید کرد. همچنین نتایج حاصل از آزمون PCR نشان داد که تمامی سویه ها (۱۰۰ درصد)واجد ژن mecA بودند.

پس از بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به ۱۸ آنتی بیوتیک مورد نظر، مشخص گردید (نمودار ۱) که ۱۰۰ درصد سویه ها نیز نسبت به پنی سیلین مقاوم بودند. بالاترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، آمیکاسین، کانامایسین، توبرامایسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین مشاهده گردید. تمامی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های سینرسید، لینزولید و ونکومایسین حساسیت نشان دادند. علاوه بر این فوزیدیک اسید، کلرامفنیکل و نیتروفورانتوئین نیز به عنوان آنتی بیوتیکهای موثری بر علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بودند و کمتر از ۵ درصد سویه ها نسبت به آنها مقاومت نشان دادند.



نمودار ۱. فراوانی و درصد مقاومت سویه هایاستافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف

از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه، ۲ سویه نسبت به تمامی آنتی بیوتیکبه استثناء ونکومایسین، لینزولید و سینرسید مقاومت نشان دادند. همچنین ۳ سویه نیز نسبت به ۱۴ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. نکته حائز اهمیت حساسیت ۳ درصد سویه ها نسبت به تمامی آنتی بیوتیک ها به استثناء پنی سیلین و مقاومت ۶۶ سویه (۷۰ درصد) نسبت به ۸ آنتی بیوتیک مورد استفاده در خطوط اول و دوم درمانی عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس است.

پس از انتخاب ۹۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به روش دیسک دیفیوژن، MIC سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک اگزاسیلین به روش Etes مشخص گردید (جدول ۱). نتایج حاصل از آزمون MIC نشان داد که ۶۱ سویه (۶۵ درصد) دارای MIC برابر یا بیش از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بودند و مقاومت بسیار بالایی را نسبت به اگزاسیلین نشان دادند. همچنین ۳ سویه (۳ درصد) نیز پایینترین میزان مقاومت (MIC برابر ۴ میکروگرم بر میلی لیتر) نسبت به اگزاسیلین را نشان دادند. در این مطالعه۲۳ سویه (۲۵ درصد) دارای MIC برابر یا بیش از ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر بودندو ۷ سویه (۷ درصد) نیز از مقاومت معمول(MIC بین ۲۴ تا ۹۶ میکروگرم بر میلی لیتر) نسبت به متی سیلین برخوردار بودند. نتایج حاصل از آزمون Etest در مورد آنتی بیوتیک ونکومایسین نشان داد که ۱۰۰ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به ونکومایسین حساس بودند و هیچ کدام از سویه ها از مقاومت حد واسط نیز برخوردار نبودند.

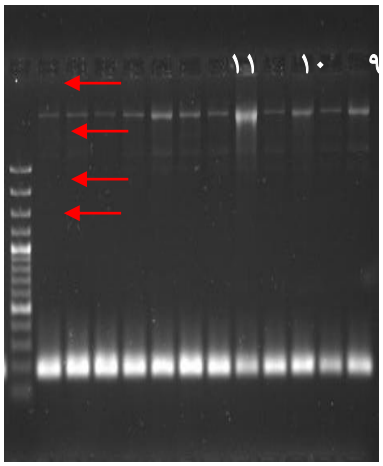
جدول ۱. نتایج آزمون حداقل غلظت مهار کننده آنتی بیوتیک اگزاسیلین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

MIC (µg/ml)	۲۵۶	۱۲۸	۹۶	۶۴	۳۲	۲۴	۴
تعداد	۶۱	۲۳	۳	۱	۲	۱	۳
درصد	۶۵	۲۵	۳	۱	۲	۱	۳

در میان سویه های جدا شده از هر دو بیمارستان ، پروفاژ SGF و زیرگروه های SGFb و SGFa فراوانترین پروفاژها بودند و ۱۰۰ درصد (۹۴ سویه) سویه ها واجد آنها بودند. همچنین در این سویه ها، پروفاژ SGA از کمترین فراوانی برخوردار بود و تنها ۳ سویه (۳ درصد) واجد این پروفاژ تایپ بودند. اما در میان سویه های جدا شده در مجموع ۳ الگوی مختلف مشاهده گردید. ۷۸ درصد از سویه ها واجد پروفاژ تایپ SGF و دو ساب تایپ SGFa و SGFb بودند؛ همچنین ۱۹ درصد نیز واجد ۲ پروفاژ تایپ SGB، SGF و ۲ ساب تایپ SGFa و SGFb بودند. بنابراین، الگوی شماره ۳ به عنوان غالب‌ترین الگو در میان این سویه ها تعیین گردید. الگوی شماره ۱ که واجد ۳ پروفاژ تایپ SGA، SGB، SGF و دو ساب تایپ SGFa و SGFb بود، تنها در سویه هایی مشاهده گردید که نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای مورد استفاده به استثناء پنی سیلین حساسیت نشان دادند و از پایین ترین میزان MIC(۴ بمیکروگرم بر میلی لیتر) برخوردار بودند. هیچکدام از پروفاژ تایپ های SGD و SGL در هیچکدام از سویه ها شناسایی نشد. نتایج حاصل از آزمون PCR برای جستجوی ژن sea نشان داد که ۱۰۰ درصد سویه ها واجد ژن مولد انتروتوکسین A بودند (تصویر ۱).

جدول ۲. فراوانی الگوهای مختلف پروفاژ تایپ در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

الگو	SGA	SGB	SGF	SGFa	SGFb	فراوانی
۱	+	+	+	+	+	۳ (٪۳)
۲	-	+	+	+	+	۱۸ (٪۱۹)
۳	-	-	+	+	+	۷۳ (٪۷۸)



تصویر ۱. آزمون PCR جهت شناسایی ژن sea در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین.۱: کنترل مثبت. ۱۲-۲: نمونه‌های مربوط به جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی-سیلین.۱۳: نشانگر ۳۰۰۰bp. باند مورد انتظار ۱۸۰ bp مربوط به ژن sea مشاهده گردید.

بحث

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص گردید که فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در ۲ بیمارستان مورد نظر در شهر تهران ۲۴/۸ درصد بود. تا کنون آمار متفاوتی از شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در ایران گزارش شده است. در سال ۲۰۰۷ میزان شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در همدان ۳۱/۴ درصد (۱۷)، در شیراز ۹۰-۳۸ درصد گزارش شده است(۱۸, ۱۹). در کاشان، شجری و منیری میزان مقاومت را در طی ۲ مطالعه مختلف ۹۶ و ۶۰ درصد گزارش کردند(۲۰, ۲۱). در تهران میزان مقاومت در طی سالهای ۱۳۸۳ تا ۱۳۹۱ از ۹۰-۱۹/۵ درصد متفاوت بوده است(۱۵, ۱۶, ۲۸-۲۲). بنابراین به نظر می رسد که در مقایسه با سایر مطالعات انجام گرفته در تهران و سایر شهرها، شیوع پایینی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را در این مطالعه شاهد بودیم.از دلایل این پایین بودن مقاومت در مقایسه با سایر گزارشات می‌توان به استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استاندارد خارجی، رعایت دقیق استانداردهای اعلام شده از جانب CLSI و در نهایت تعیین حداقل غلظت مهارکننده اگزاسیلین با استفاده از Etest اشاره نمود. همچنین باید توجه داشت که جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس در این مطالعه از ۲ بیمارستان خصوصی به دست آمدند. علاوه بر این، آزمایشگاه یکی از این بیمارستان ها از جمله آزمایشگاه های مرجع در شهر تهران به شمار می رود و از قدمت بالایی نیز برخوردار است. بسیاری از مراجعه کنندگان به این بیمارستان با توجه به تعریف مرکز کنترل بیماری‌ها به‌عنوان بیمار سرپایی شناخته می شوند(۲۹) که همین امر خود می‌تواند یکی از دلایل پایین بودن میزان شیوع جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی-سیلین در این مطالعه باشد.در اسپانیا در سال ۲۰۰۷ شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ۳۰/۵ درصد بود(۳۰). میزان مقاومت در پاکستان در سال ۲۰۰۷ ۳۲ درصد گزارش شده است(۳۱). در مطالعه ای که در کانادا در سال ۲۰۰۱ در طی ۵ سال بر روی ۴۵۰۷ بیمار انجام گرفت، شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در طی این ۵ سال از ۰/۹۵ به ۵/۹۷ درصد افزایش پیدا کرد و بیش ترین افزایش در بیمارستان های اونتاریو، کبک و نواحیه غربی کانادا بوده است(۳۲). فراوانی این سویه ها در هلند و سوئد کمتر از ۱ درصد تا ۵۴ درصد در پرتغال متفاوت گزارش شده است(۳۳). تفاوت‌هایی که در میزان مقاومت استافیلوکوکوس اورئوسنسبت به آنتی‌بیوتیک هادر کشورهای مختلف و یا در بیمارستان های مختلف یک کشور مشاهده می شوند، به دلیل تفاوت‌هایی است که در سیاست های درمان بیماران و یا کنترل بهداشت بیمارستان به کار گرفته می‌شوند. روش های مختلف کشت و جداسازی، سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی، تفاوت های جغرافیایی و جمعیت های مورد مطالعه نیز باعث تفاوت در آمارهای ارائه شده می شوند. هم چنین مواردی مانند تجویز نامناسب و فراوان آنتی‌بیوتیک ها در عفونت های غیرباکتریایی، کامل نشدن دوره درمان و در دست رس بودن آسان آنتی‌بیوتیک ها به ظهور و گسترش جدایه‌های چندمقاومتی کمک می‌کند. آنتی‌بیوتیک هایی که به‌عنوان خطوط بعدی درمان، انتخاب و تجویز می‌شوند اغلب گران‌تر و در مواردی نیز سمی هستند.میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک های سیپروفلوکساسین، توبرامایسین، کانامایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، آمیکاسین و تتراسایکلین بیش از سایر آنتی‌بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه بود. بنابراین می‌توان گفت که در استفاده‌های درمانی نمی توانند اثرات قابل ملاحظه‌ای داشته باشند. در ایران از آنتی‌بیوتیک های اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود و همین امر می‌تواند دلیلی جهت افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک ها باشد. هم چنین برخی مطالعات نشان می-دهند که امکان انتقال پلاسمیدهای مقاومت به تتراسایکلین در میان بسیاری از گونه‌ها و جنس‌های مختلف باکتریای وجود دارد(۲۸)؛ این مقاومت حتی از جدایه-های حیوانی نیز به جدایه‌های انسانی قابل انتقال است. این آنتی‌بیوتیک امروزه جهت مصارف دامی به‌عنوان یک افزودنی به غذای دام ها مورد استفاده قرار می-گیرد. علاوه بر ونکومایسین که پیش تر اشاره گردید، جنتامایسین نیز از جمله آنتی‌بیوتیک های مؤثر بر علیه جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی-سیلین می‌باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، تمامی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به سینرسید، کلرامفنیکل، لینزولید و ونکومایسین حساسیت کامل داشتند و هیچ گونه مقاومتی نسبت به این آنتی‌بیوتیک ها در میان جدایه‌های بالینی مشاهده نشد. در شیراز نیز نشان داده شد که تمامی جدایه‌ها نسبت به سینرسید، لینزولید و ونکومایسین، حساس بودند(۱۹).

در این مطالعه در مجموع ۹۰ درصد از سویه ها از مقاومت بسیار بالایی نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند. در مورد میزان MIC اگزاسیلین سویه های استافیلوکوکوساورئوسمقاوم به متی سیلین گزارشات مختلفی در دست است. در مطالعات مختلفی در شهر تهران، بیشتر سویه ها از مقاومت بالایی نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند. در اهواز در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد که ۹۳ درصد از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین دارای MIC برابر یا بیش از ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتربودند(۳۴). در مطالعه جوان و هم کاران نیز ۹۵/۹ سویه ها ازMIC برابر یا بیش از ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر برخوردار بودند(۲۵). در سال ۲۰۰۹ در سوییس۲۹ درصداز جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین دارایMIC برابر یا بیش از ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتربودند و ۱۳ درصد آن نیز دارای برابر یا بیش از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتربودند(۳۵). وجود جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با حداقل غلظت مهارکننده بالا که ناشی از تجویز بی‌رویه و مصرف خود سرانه دارو است،در صورت عدم اجرای برنامه‌های مناسب در جهت نظارت بسیار بیش تر بر تجویز و مصرف دارو،عواقب بسیار ناگواری از قبیل افزایش عفونت های مقاوم به دارو، افزایش هزینه های درمان، نیاز به نسل های جدیدتر آنتی‌بیوتیک‌با قیمت‌های بالاتر و عوارض بیش تر را به همراه خواهد داشت.

یکی از راه های شناسایی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، بررسی وجود ژن mecA در این جدایه ها است. در این مطالعه تمامی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین واجد ژن mecA بودند و وجود این ژن در تمامی جدایه‌ها تأیید گردید. روش PCR جهت شناسایی ژن mecA به عنوان استاندارد طلایی شناخته شده است. در مطالعات رحیمی و هم کاران نیز ۱۰۰ درصد سویه ها واجد ژن mecA بودند(۱۵, ۱۶, ۲۶). در مطالعه جوان و هم کاران، ۵ درصد از سویه های استافیلوکوکوساورئوسمقاوم به متی سیلین فاقد ژن mecA بودند و این پدیده را ناشی از جهش در ژن مقاومت به متی سیلین و هم چنین وجود تفاوت های فیزیولوژیکی در میان سویه ها دانسته اند(۲۵). در مطالعاتی در مقدونیه و در اسپانیا، PCR ژن mecA به‌عنوان بهترین روش جهت شناسایی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی شد(۳۶, ۳۷).

در این مطالعه از آزمون Multiplex-PCR جهت بررسی وجود ژن های مربوط به پروفاژهایSGA، SGB، SGF، SGFa،SGFb،SGD و SGLSGFb در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین استفاده گردید؛ و در مجموع۳ پروفاژ تایپSGA (۳ درصد)SGB (۲۲ درصد)، SGF (۱۰۰ درصد) و دو ساب تایپSGFa (۱۰۰ درصد) و SGFb (۱۰۰ درصد) در میان سویه ها شناسایی شد. هم چنین در این مطالعه تمامی سویه ها فاقد پروفاژ تایپ هایSGL و SGDبودند. با یک نگاه اجمالی به این سویه ها مشخص می‌شود که تمامی این سویه ها به‌طور بالقوه قابلیت تولید طیف وسیعی از عوامل حدت وابسته به باکتریوفاژها را دارا هستند و انتشار بیش تر آنها در بیمارستان ها و جامعه می‌تواند یک هشدار برای سلامت و بهداشت عمومی باشد و نیاز به تدوین برنامه‌های کنترلی مدون جهت جلوگیری از انتشار این جدایه‌ها احساس می‌گردد.

در سال ۲۰۰۴ در جمهوری چک در بررسی وجود پروفاژ تایپ های مختلف در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در نمونه‌های بالینی، ۵ پروفاژ تایپ SGA، SGB، SGF، SGFa و SGFb و ۹ الگوی پروفاژی در میان جدایه ها شناسایی گردید و پروفاژ تایپ SGFa به‌عنوان پروفاژ تایپ غالب در جمهوری چک تعیین شد(۱۴). در آمریکا نیز در سال ۲۰۰۶، ۶ پروفاژ تایپ SGA، SGB، SGF، SGFa، SGFb و SGLو ۱۰ الگوی پروفاژی در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا از آب سواحل هاوایی شناسایی گردید(۸). در ایران نیز، در طی ۲ مطالعه در سال های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ درمجموع ۵ پروفاژ تایپ در میان سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شهر تهران شناسایی گردید و پروفاژ تایپ SGF به عنوان تایپ غالب تعیین شد(۱۵, ۱۶).

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تولید طیف وسیعی از پروتئین‌ها از جمله انتروتوکسین است که می‌تواند باعث ایجاد ناراحتی های گوارشی و مسمومیت های غذائی در افراد شود. شیوع مسمومیت با انتروتوکسین A استافیلوکوکوسی بیش تر از سایر انتروتوکسین ها است، بنابراین از اهمیت بیش تری نیز در مقایسه با سایر انتروتوکسین های استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار است(۳۸). روش های مختلفی برای شناسایی انتروتوکسین های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از جمله آگلاتیناسیون لاتکس ، الایزا، ایمونودیفوژن و رادیو ایمنواسی وجود دارند که در همه این روش‌ها نیاز به فراهم شدن شرایطی برای بیان شدن ژن انتروتوکسین‌استافیلوکوکوسی است. این در حالی است که ممکن است باکتری در شرایط خاص به رغم داشتن ژن تولید کننده سم قادر به تولید آن نبوده و نتایج به‌دست آمده در روش های فوق الذکر را منفی گرداند. اشکال عمده تمامی روش‌های فول الذکر علاوه بر صرف زمان جهت ایجاد شرایط مناسب برای تولید سم توسط باکتری و وجود واکنش های متقاطع، امکان ایجاد پاسخ های کاذب است(۳۹). اما در روش مولکولی که با شناسایی ژن رمزکننده سم انجام میشود، می‌توان پیش از تولید سم توسط باکتری، ژن های رمزکننده انتروتوکسین های استافیلوکوکوسی را شناسایی و دسته‌بندی نمود. این روش ها علاوه بر داشتن سرعت بالا، از حساسیت و اختصاصیت بالایی نیز برخوردار هستند(۴۰). در این مطالعه ۱۰۰ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین واجد ژن sea بودند. در مطالعه براتی و هم کاران در سال ۲۰۰۶ در ایران، در بررسی ۹۸ نمونه مربوط به بیماران، ناقلین سالم و نمونه‌های محیطی، مشخص گردید که ۷ درصد از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن sea بودند(۴۱). ایمانی فولای و هم کاران نیز در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ۱۰۰ نمونه مواد لبنی در ایران دریافتند که ۳۲ درصد از نمونه‌ها واجد استافیلوکوکوس اورئوس بودند و فراوانی ژن sea در میان این سویه ها ۱۵/۶ درصد بود(۴۲). در مطالعه سال ۲۰۱۱ سعادتی و هم کاران بر روی ۱۵۰ نمونه جدایه به‌دست آمده از ناقلین بینی، ۴۳/۱ درصد از جدایه‌ها از نظر ژن‌های sea، sec و seq مثبت بودند. ۲۵/۳ درصد واجد ژن sea، ۹/۵ درصد واجد ژن sec و ۸/۴ درصد واجد ژن seq بودند(۴۳). پورمند و هم کاران در سال ۲۰۰۹ در بررسی ۱۲۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بیماران در ایران نشان دادند که فراوانی ژن sea در میان این جدایه‌ها ۴۶/۹ درصد بود(۴۴).در آلمان در سال ۲۰۰۳ ، نشان داده شد که از ۹۳ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مدفوع بیماران، ۱۳ درصد واجد ژنsea بودند(۴۵). محققان در سال ۲۰۰۲ در اسلواکی در بررسی نمونه‌های مواد غذایی و تولیدکنندگان مواد غذایی مختلف توانستند ۲۰ جدایه (۳۹ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس مولد سم را شناسایی نمایند. سه جدایه مولد انتروتوکسینA، ۱۲ جدایه مولد انتروتوکسینB و ۵ جدایه نیز مولد هر دو سم بودند(۴۶).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده تفاوت بسیار زیادی از نظر شیوع ژن مربوط به انتروتوکسینA در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به سایر مطالعات مشابه است. در تمامی ۹۴ جدایه مورد مطالعه ژن sea شناسایی گردید و ۱۰۰ درصد جدایه‌ها واجد این ژن بودند. به‌واسطه این‌که اطلاعات کاملی در مورد وجود باکتری-خوارهای مختلف در مطالعات گذشته ارائه نشده است، بنابراین نمی‌توان تفسیر کاملا صحیحی در این مورد ارائه داد. اما در این مطالعه همان گونه که پیش تر اشاره گردید، جدایه ها واجد تمامی پروفاژ تایپ های موثر در به رمز درآوردن عوامل حدت در استافیلوکوکوس اورئوس بودند؛ بنابراین انتظار می‌رفت که در جدایه‌های مختلف ژن sea شناسایی گردد. اما یکی از دلایل دیگر اختلاف در نرخ فراوانی این ژن ها می‌تواند ناشی از منشاء جداسازی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس در کشورهای مختلف باشد(۴۷, ۴۸). اما تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه صورت نگرفته است که به‌صورت هم زمان وجود ژن های مربوط به عوامل حدت و هم چنین عوامل رمزکننده این عوامل را در منابع مختلف نشان دهد، بنابراین تنها می‌توان به دلایل مطرح شده بسنده کرد. از آنجا که انتروتوکسین A شایع‌ترین عامل ایجاد مسمومیت های غذائی و ناراحتی های گوارشی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس به‌شمار می‌رود، بنابراین شیوع بالای ژن رمزکننده این سم و هم چنین بیان این ژن در جدایه های مورد مطالعه در بیمارستان ها می‌تواند یک هشدار و خطر جدی برای بهداشت جامعه باشد. از فواید غیرقابل انکار این مطالعه می‌توان به شناسایی ژن عامل ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکوسی حتی پیش از تولید سم اشاره کرد. بنابراین، با استفاده از روش PCR می‌توان کانون های خطر را به سرعت شناسایی نمود و از بروز مسمومیت احتمالی جلوگیری به‌عمل آورد.

نتیجه گیری

کنترل عفونت های استافیلوکوکوسی چندمقاومتی بسیارمشکل است وهیچ راه درمانی سنتی و مشخصی در این زمینه وجود ندارد. در این حالت کنترل سرایت این قبیل میکروارگانیسم‌ها اهمیت زیادی دارد و روش‌های دسته بندی فنوتیپی و ژنوتیپی در تشخیص کلونالیتی جدایه‌ها و کنترل بهتر آنها بسیار سودمند خواهند بود. برای سیستم مراقبت بهداشتی هر جامعه بسیار لازم وضروری است که عوامل بیماری زای مهم و شایع بیمارستانی را به‌درستی شناسایی نماید و الگوی دقیق مقاومت آنتی-بیوتیکی آنها را مشخص نماید تا روش های پیش گیری ودرمان مؤثری جهت کنترل آنها به‌کار گرفته شود. مطالعات منطقه‌ای با هدف دست یابی به اطلاعات در مورد گونه و نوع استافیلوکوکوس ها و هم چنین مقاومت آنها می‌تواند به پزشکان در انتخاب دستورالعمل درمانی مناسب راه کارهای درستی را ارائه نماید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فن آوری دانشگاه اصفهان و هم چنین حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن آوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به انجام رسیده است.

REFERENCES

1. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clinical Microbiology Reviews. 1997;10(3):505-20.

2. von EC, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. Study Group. The New England Journal of Medicine. 2001;344(1):11-16.

3. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins. 2010;2(8):2177-97.

4. Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A, Lodi R. Phenotypicand genotypic characterization of Staphylococcus aureus strains from Italian dairy products. International Journal of Microbiology. 2009;2009:501362.

5. Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborneStaphylococcus aureus strains isolated in the Marmara Region of Turkey. International Journal of Food Microbiology. 2011;148(2):99-106.

6. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cellular and Molecular Life Sciences. 2010;67(18):3057-71.

7. Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N, Guh A, Wang X, Gialanella P, Levi MH, Kreiswirth BN, Fries BC. Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of Staphylococcus aureus isolates from the Bronx, New York. Applied and Environmental Microbiology. 2009;75(21):6839-49.

8. Workman M, Nigro O, Steward G. Identification of prophages in coastal water isolates of Staphylococcus aureus. Journal of Young Investigators. 2006;15:1-8.

9. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. The New England Journal ofMedicine. 1998;339(8):520-32.

10. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2010;9(1):23.

11. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute,Wayne, Pa. 2006.

12. ZouharovaM, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA Identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains from bulk tank milk. Zoonoses and public health. 2008;55(6):313-9.

13. McClure J-A, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, Zhang K. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from resistant staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(3):1141-4.

14. Pantůček R ,Doškař J, Růžičková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardová V, Rosypal S. Identification of bacteriophage types and their carriage in Staphylococcus aureus. Archives of Virology. 2004;149(9):1689-703.

15. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M. Prophage Typing of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Isolated from a Tertiary Care Hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(1):80-5.

16. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profilesof methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in Iran. Archives of Virology. 2012;157(9):1807-11.

17. Zamani A, Sadeghian S, Najafi Mosleh M, Goudarzi M, Yousefi Mashouf R, Ghader Khani J. Detection of methicillin-resistance (mecA) gene in Staphylococcus aureus strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. Nasim Danesh. 2007;57:273-6.

18. Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasouli M, Farshad S. Distribution patterns of methicillin resistance genes (mecA) in Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens. Iranian Biomedical Journal. 2004;8(4):173-8.

19. Japoni A, Jamalidoust M, Farshad S, Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni S, Rafaatpour N. Characterization of SCCmec types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistantStaphylococcus aureus in southern Iran. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2011;64(1):28-33.

20. Moniri R, Shafiee M. The survey on prevalence and risk factors for antibiotic-resistant Staphylococcus aureus isolated from samples in Kashan hospitals .Journal of Zanjan University of Medical Science. 2008;16:73-82.

21. Reza SG, Rezvan M. Antibiotic susceptibility and resistance pattern of Staphylococcus aureus isolated from samples sent to central laboratory of Kashan. Feiz. 2002;6:31-6.

22. Aligholi M ,Emaneini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, Sedaght H. Emergence of high-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. Medical Principles and Practice. 2008;17(5):432-4.

23. Aminzadeh Z, Mastari FarahaniA, Gachkar L. Prevalence of Staphylococcus aureus careers in chronic hemodialysis patients referred to hemodialysis ward in Dr. Labbafinejad hospital and detection of antimicrobial resistance pattern. Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine. 2004;9:23-8.

24. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, Nouri K, Sedaghat H, Feizabadi MM. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microbial Drug Resistance. 2008;14(3):217-20.

25. Javan E, Falahati HR, Saifi M, Talebi M, Pourshafie MR. Study of mecA gene among high level oxacillin resistance Staphylococcus aureus strains isolated from Tehran hospitals .Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine. 2010;15:17-22.

26. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic Resistance Pattern of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus Isolates in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2013;6:144-9.

27. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among Staphylococcus spp. with emphasis on detection of mecA gene in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.

28. Vahdani P, Saifi M, Aslani MM, Asarian AA, Sharafi K. Antibiotic resistance patterns in MRSA isolated from patients admitted in ICU infectious ward. Tanaffos. 2004;3:37-44.

29. 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.

30. Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, Castellares C, Trincado P, Cabrera R, Vindel A. Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Spain: a multicentre prevalence study (2002). Clinical Microbiology and Infection. 2007;13(3):250-6.

31. Bashir A, Mujahid TY, Jehan N. Antibiotic resistance profile: Isolation and characterization of clinical isolates of staphylococci from patients with community-acquired skin infections. Pakistan Journalof Pharmaceutical Sciences. 2007;20(4):299-304.

32. Simor AE, Ofner-Agostini M, Bryce E, Green K, McGeer A, Mulvey M. Theevolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Canadian hospitals: 5 years of national surveillance. Canadian Medical Association Journal. 2001;165(1):21-6.

33. Lim D, Strynadka NC. Structural basis for the β lactam resistance of PBP2a frommethicillin-resistant Staphylococcus aureus. Nature Structural and Molecular Biology. 2002;9(11):870-6.

34. Ekrami A, Samarbafzadeh A, Alavi M, Kalantar E, Hamzeloi F. Prevalence of methicillin resistant Staphylococcus species isolated from burn patients ina burn center, Ahvaz, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2011;3(2):84-91.

35. Ender M, Burger S, Sokoli A, Zbinden R, Berger-Bachi B, Heusser R, et al. Variability of SCCmec in the Zurich area. European Journal of Clinical Microbiology andInfectious Diseases. 2009;28(6):647-53.

36. Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: comparison of susceptibility test methods with mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in our clinical isolates. Bratislava Medical Journal. 2005;106(4-5):163-7.

37. Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005;55(3):379-82.

38. Bystron J, Molenda J, Bania J, Kosek-Paszkowska K, Czerw M. Occurrence of enterotoxigenic strains of Staphylococcus aureus in raw poultry meat. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2004;8(1):37-40.

39. Park C, Akhtar M, Rayman M. Simple solutions to false-positive staphylococcal enterotoxin assays with seafood tested with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA). Applied and Environmental Microbiology. 1993;59(7):2210-3.

40. Garcia-Garcia AB, Blesa S, Martinez-Hervas S, Mansego ML, Gonzalez-Albert V, Ascaso JF, Carmena R, Real JT, Chaves FJ. Semiquantitative multiplex PCR: a useful tool for large rearrangement screening and characterization. Human mutation. 2006;27(8):822-8.

41. Barati B, Saadati M, Kh BM. Isolation and Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus Type A by multiplex PCR. Journal of Military medicine. 2006;8(2):119-28.

42. Imani Fooladi AA, Tavakoli HR, Naderi A. Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolates in domestic dairy products. Iranian Journal Microbiology. 2010;2:135-40.

43. Saadati M, Barati B, Doroudian M, Shirzad H, Hashemi M, Hosseini SM, Salehi Chaleshtari AR, Bahmani MK, Hosseinzadeh S, Imani S. Detection of Sea, Seb, Sec, Seq genes in staphylococcus aureus isolated from nasal carriers in Tehran province, Iran; by multiplex PCR. Journal of Paramedical Sciences. 2011;2(2):34-40.

44. Pourmand MR, YazdchiSahar B. High prevalence of sea gene among clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran. Acta Medica Iranica. 2009;47(5):357-361.

45. Klotz M, Opper S, Heeg K, Zimmermann S. Detection of Staphylococcusaureus enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41(10):4683-7.

46. Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Kalinacova V, Gondol J, Grolmus J. Occurrence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in food. Annals ofAgricultural and Environmental Medicine. 2002;9:179-82.

47. Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes. 2005;19(5):299-305.

48. Najera-Sanchez G, Maldonado-Rodriguez R, Olvera PR, de la Garza LM. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of Staphylococcus aureus isolated from foods. Journal of Food Protection. 2003;66(6):1055-62.