فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰- شماره ۳- پاییز-۱۳۹۴

مقاله تحقیقی

تعیین فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیمارستان‌های اهواز

سحرناز ربیعی، سحر هنرمند جهرمی، شهره زارع کاریزی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران، آدرس الکترونیکی:shohrehzare@yahoo.com

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه تحقیقاتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و جامعه به شمار می‌رود. امروزه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به دلیل مصرف بیش از حد رو به افزایش می‌باشد و این مسئله موجب نگرانی در سرتاسر جهان شده است. این مطالعه به منظور تعیین میزان فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به تتراسایکلین جدا شده از نمونه‌های بالینی و هم‌چنین تعیین میزان ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین Tet(M,O,K,L,S) در بیمارستان‌های شهر اهواز انجام پذیرفت.در این پژوهش ۲۳۱ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از چهار بیمارستان شهر اهواز جمع‌آوری شد. آزمایش‌های تشخیصی شامل رنگ‌آمیزی گرم، کواگولاز، کاتالاز، مانیتول سالت آگار و DNase انجام گردید. برای هر یک از نمونه‌ها مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین توسط روش دیسک دیفیوژن سنجیده شد. ۴۸/۴درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم، ۱۷/۰۹ درصد حدواسط و ۳۴/۴ درصد حساس به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بودند. پس از استخراج DNA، وجود ژن‌های Tet(K,M,L,O,S) به روش مالتی‌پلکس PCR مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از 16SrRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. ۴۶ سویه(۳۸ درصد) دارای ژنTet-M، ۴۱ سویه (۳۴درصد) دارای ژنTet-K، ۲۱ سویه (۱۲درصد) دارای ژن Tet-L و ۱۲ سویه (۱۰درصد) دارای ژن Tet-O بودند. ژن Tet-S در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های (Tet-S و Tet-K, Tet-M, Tet-O, Tet-L)

مقدمه

استافیلوکوک‌ها از نخستین باکتری‌های بیماریزای شناخته شده می‌باشند.این باکتری‌ها انتشار وسیعی در طبیعت دارند. این ارگانیسم بخشی از فلور نرمال انسان است، ولی در طول دهه‌های گذشته به یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی تبدیل شده و سردسته عامل عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان محسوب می‌شود(۱). این پاتوژن می‌تواند موجب بروز بازه‌ی وسیعی از علائم و مشکلات بالینی شامل سپتی‌سمی، پنومونی، عفونت‌های زخم، آرتریت عفونی، استئومیلیت و سندروم شوک سمی‌شود که معمولاً این علائم به دنبال اعمال جراحی اتفاق می‌افتد و باعث آمار متفاوتی از عوارض دیگر مانند باکتریمی

و در نهایت مرگ ومیر می‌شود (۲،۳). یکی از علل مهم موفقیت این ارگانیسم در ایجاد بیماری، تنوع بروز آن در مکان‌ها و دوره‌های زمانی مختلف می‌باشد. با وجود اینکه عفونت‌های ناشی از این پاتوژن انسانی می‌تواند همه جمعیت را تحت تأثیر قرار دهد ولی این عفونت‌ها در افراد مسن، کودکان و بیماران دچار نقص ایمنی می‌تواند بسیار شدید و خطرناک باشد (۴،۵).

استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل قدرت بیماریزایی بالقوه و مقاومت روزافزون در برابر داروهای ضد باکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است(۱).

پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در استافیلوکوکوساورئوس، تعداد آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری را کاهش داده است. به‌طوری که در حال حاضر اغلب سویه‌های این باکتری به پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها مقاوم شده‌اند. هم‌چنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند اریترومایسین، ونکومایسین و تتراسایکلین نیز گزارش شده است(۲).تتراسایکلین‌ها از دو مسیر مختلف وارد سلول می‌شوند:

۱- عبور از طریق فضای پری‌پلاسمی مانند پورین‌های لیپیدی
۲- عبور از طریق غشای سیتوپلاسمی با انتقال فعال. تتراسایکلین‌ها پس از ورود به سلول تمایل به زیرواحد 30S ریبوزوم دارند و از انتقال آمینواسیل tRNA به محل کمپلکس آغازگر ریبوزوم و mRNA جلوگیری می‌کنند، در نتیجه سنتز پروتئین انجام نمی‌گیرد(۶).

سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس از طریق دو مکانیسم در برابر تتراسایکلین مقاوم می‌شوند: پروتئین‌های افلاکس و پروتئین‌های حفاظت ریبوزومی. ژن های کدکننده پروتئین‌های افلاکس، پروتئین‌های غشایی را کد می‌کنند که خروج تتراسایکلین از سلول را برعهده دارند. خروج تتراسایکلین از سلول، غلظت درون سلولی دارو را کاهش می‌دهد، بنابراین، ریبوزوم داخل سلولی از اثر آنتی‌بیوتیک محافظت می‌شود(۱۶).

حدود یازده ژن Tet برای کد کردن پروتئین‌های حفاظت ریبوزومی وجود دارد. تتراسایکلین با اتصال به ریبوزوم باعث تغییر شکل فضایی ریبوزوم شده در نتیجه سنتز پروتئین متوقف می‌شود. پروتئین‌های حفاظت ریبوزمی در تعامل با پروتئین h34 در ریبوزوم، باعث اختلال در سایت اتصال اولیه تتراسایکلین شده و ملکول‌های تتراسایکلین از ریبوزوم آزاد می‌گردند. سپس ریبوزوم به شکل فضایی استاندارد خود بر می‌گردد و سنتز پروتئین از سر گرفته می‌شود. پروتئین‌های حفاظت ریبوزومی مانند Tet-M و Tet-O با این مکانیسم در مقاومت به تتراسایکلین نقش دارند(۱۷).

مقاومت به تتراسایکلین در بسیاری از باکتری‌ها به علت کسب ژن جدید اتفاق می‌افتد. این ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین به وسیله عناصر متحرک هم چون ترانسپوزون‌ها و یا پلاسمیدها از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل می‌شوند(۷).

تحقیقات فراوانی روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دنیا انجام شده است. لذا در این مطالعه به بررسی میزان مقاومت به تتراسایکلین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس شهر اهواز و هم‌چنین فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین Tet(K, M, L, O, S) پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۲۳۱ نمونه بالینی استافیلوکوکوس اورئوساز خون، ادرار، خلط و تراشه‌های پوستی بیماران چهار بیمارستان سینا،ابوذر،گلستان و آریا جمع‌آوری گردید. تمامی جدایه‌ها در ابتدا با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، تست DNase و تخمیر قند مانیتول شناسایی و تایید شدند.

سپس با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین شناسایی گردید. حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس جداسازی شده براساس استانداردهای CLSI نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار

بررسی شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی از شرکت پادتن طب تهیه شد و شامل تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم بود.

در این مطالعه به منظور بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین، DNA سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به تتراسایکلین با روش فنل کلروفرم استخراج شد(۱۴).

تکثیر ژن‌های Tet-M، Tet-K، Tet-O، Tet-L وTet-S با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول۱) و روش Multiplex PCR انجام شد. برای انجام این آزمایش از دو Mix استفاده گردید، mix اول جهت تکثیر ژن‌های Tet-M، Tet-L وTet-o و Multiplex PCR دوم جهت تکثیر ژن‌های Tet-S و Tet-k طراحی گردید. لازم به ذکر است که در هر دو Multiplex PCR از پرایمر 16SrRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. در این مرحله واکنش‌های PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل1X PCR buffer، ۰/۴ میلی مولارdNTP، ۰/۴ میلی‌مولارMgCL2، ۳ میکرومول از هر کدام از پرایمرها، ۱ واحد آنزیم و ۱۰۰ng از DNA انجام شد. برنامه حرارتی شامل: یک سیکل دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۲ سیکل دمای ۹۵ درجه سانتیگراد ۵۰ ثانیه، دمای ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه.

محصولات PCR روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز گردید.پس از رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره نتایج بررسی گردید.

جدول۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین.

نام پرایمر	توالی پرایمر (5′- 3′)	طول محصول PCR(bp)
Tet-K (F) Tet-K (R)	TCG ATAGGA ACA GCA GTA CAG CAG ATC CTA CTC CTT	169
Tet-L (F) Tet-L (R)	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC GTATCCCACCAATGTAGCCG	267
Tet-M (F) Tet-M (R)	GTGGACAAAGGT ACAACG AG CGGTAA AGT TCG TCA CAC AC	406
Tet-S(F) Tet-S(R)	CAT AGA CAA GCC GTT GAC C ATG TTT TTG GAA CGC CAG AG	667
Tet-O(F) Tet-O(R)	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	515
16SrRNA(F) 16SrRNA (R)	GTAGGTGGCAAGCGTTATCC CGCACATCAGCGTCAG	228

نتایج

در این مطالعه بیشترین میزان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی ادرار (۷۲/۳درصد)، پس از آن نمونه‌های خون (۱۴/۳درصد)، خلط(۷درصد) و تراشه‌های پوستی (۶/۵درصد) جداسازی شد. از این میان، ۷۷درصد نمونه‌ها از بیماران زن و ۲۳درصد از مردان جداسازی شد. بیشترین فراوانی

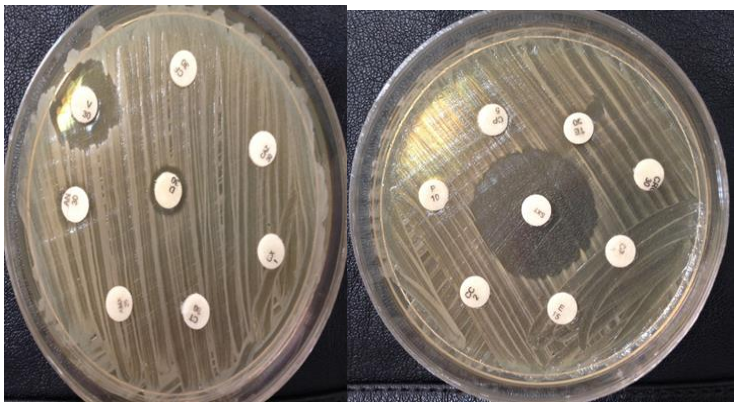
فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰- شماره ۳- پاییز-۱۳۹۴

سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از گروه سنی ۴۰ تا ۶۰ سال جمع‌آوری شد.

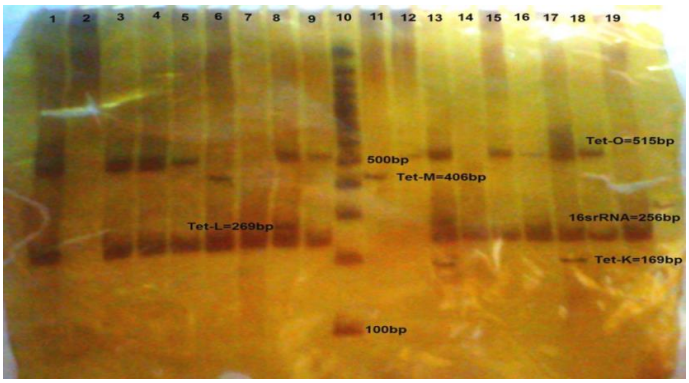
دراین مطالعه برای هر یک از ۲۳۱ نمونه بالینی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین توسط روش دیسک دیفیوژن سنجیده شد. در بررسی انجام شده از ۲۳۱ نمونه بالینی، ۱۱۲ سویه (۴۸/۴۸درصد) از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم، ۳۲ سویه (۲۸/۵۷درصد) از نمونه‌ها حالت بینابینی (نیم هحساس) و ۶۸ سویه (۶۰/۷۱درصد) حساس به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بودند (شکل۱). سپس فراوانی ژن‌های Tet-M، Tet-L ، Tet-K، Tet-O وTet-L به روش Multiplex PCR بررسی شد(شکل۲).

فراوانی هر یک از ژن‌های کدکننده مقاومت به تتراسایکلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در جدول۲ ارائه شده است. هم‌چنین فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین به تفکیک منبع جداسازی در هر یک از نمونه‌های بالینی در نمودار۱ نمایش داده شده است.

همچنین، هم‌زمانی حضور ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین بررسی گردید. ۳۰ سویه حاوی دو یا سه ژن مقاومت به تتراسایکلین بودند. ۱۲/۵درصد دارای ژن‌های Tet(K,M) ، ۵/۳۵درصد از سویه‌ها دارای ژن‌های Tet(K,L)، ۴/۴۶درصد دارای ژن‌های Tet(L,M)، ۵/۳۵ درصد از جدایه‌ها نیز حاوی ژن‌های Tet(M,O) و ۴ سویه-(۳/۵۷درصد) درای سه ژن مقاومت به تتراسایکلین Tet(M,O,K) بودند.



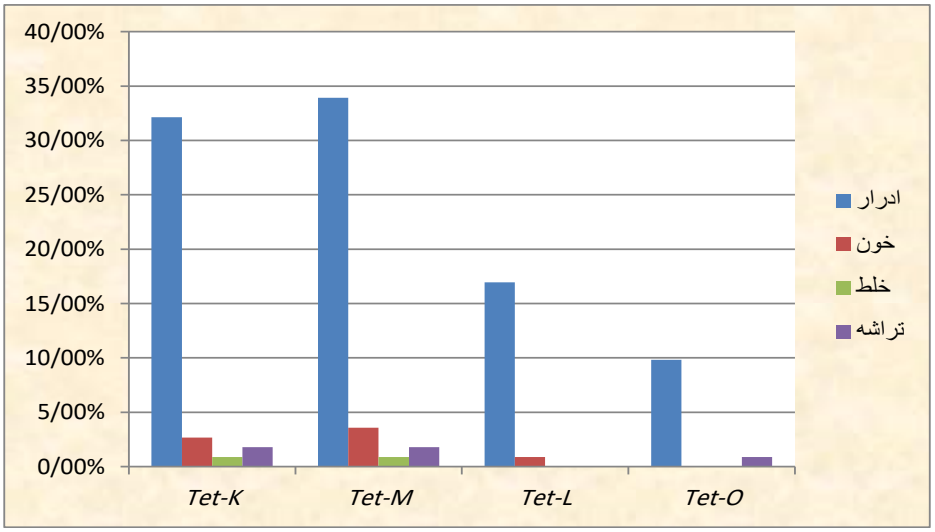
شکل۱-تصویررشد و عدم رشد باکتری‌ها در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی درمحیط مولر هینتون آگار.



شکل۲ –نمایش ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین روی ژل اکریلآمید ۱۲درصد: چاهک¬های ۱، ۳،۴،۵،۸،۹،۱۳،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸: ژن Tet-O،چاهک‌های ۶،۱۱ :ژنTet-M،چاهک‌های۸ و۱۳: ژن Tet-L و چاهک‌های ۱۳ و ۱۷ ژنTet-K را نمایش می‌دهند. همچنین چاهک شماره ۱۰ سایز مارکر۱۰۰ جفت باز می‌باشد.

جدول۲ - بررسی فراوانی هر یک از ژن‌های کد کننده مقاومت به تتراسایکلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس.

ژن مقاومت به تتراسایکلین	هر یک از ژن‌های مقاومت(درصد)
Tet-M	۳۸درصد
Tet-K	۳۴درصد
Tet-L	۱۸درصد
Tet-O	۱۰درصد
Tet-S	۰



نمودار۱ - فراوانی هر یک از ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در هر یک از نمونه‌های بالینی.

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل قدرت بیماریزایی بالقوه و مقاومت روز افزون در برابر داروهای ضدباکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است. افزایش روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری و به تبع آن گسترش عفونت‌های ناشی از آن ها در بیمارستان‌ها و جامعه توجه مجامع علمی را به خود معطوف کرده است(۸).

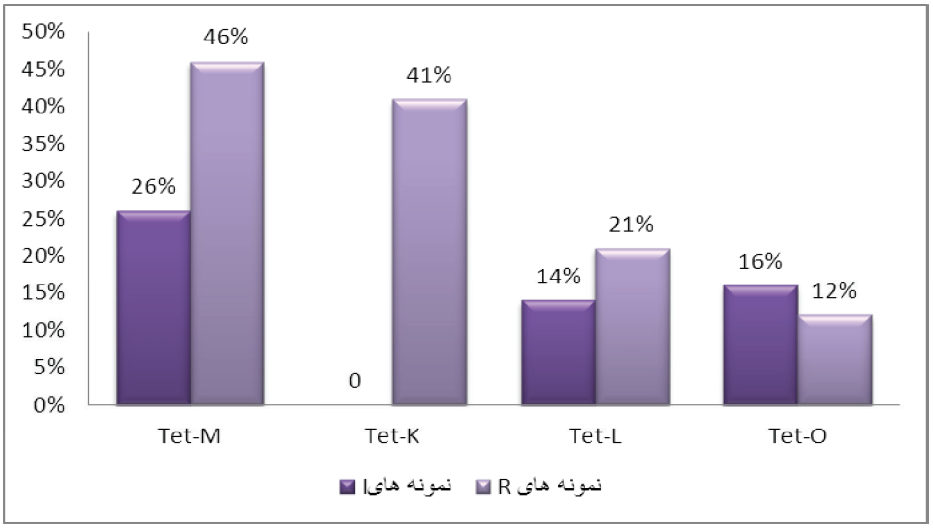
در مطالعه حاضر الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین توسط هر دو روش انتشار دیسک و روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. ایجاد مقاومت به تتراسایکلین در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به علت حضور ژن‌های مقاومت به این آنتی‌بیوتیک می‌باشد. ژن‌های Tet(M,O,L,K,S,W) شایع‌ترین ژن‌های مقاومت در باکتری‌های گرم مثبت از جمله استافیلوکوکوس اورئوس هستند. در این مطالعه فراوانی ژن‌های Tet-K, Tet-M, Tet-O, Tet-L, Tet-S مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بیمارستانی شهر اهواز را نشان می‌دهد.

در این مطالعه ۴۸/۴۸ درصد سویه‌ها مقاوم به تتراسایکلین بودند. فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به تتراسایکلین در مطالعات مختلف متفاوت است. Ullah و همکاران (۱۱) درسال ۲۰۱۲ در پاکستان شیوع سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به تتراسایکلین را ۵۷درصد و Trzcinski و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۰۰ این میزان را ۶۶درصد گزارش کردند. درسال ۱۳۹۱ درکرمانشاه، احمدی و همکاران میزان شیوع سویه-های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به تتراسایکلین را بیش از مطالعه حاضر و در حدود ۷۶درصد گزارش کردند. در حالی‌که اکبرزاده و همکاران در تبریز(۱۳۸۶) مقاومت را ۳۶ درصد و رحیمی در اصفهان(۱۳۸۸)، ۶۴درصد اعلام کردند. علت تفاوت در نتایج مطالعات مختلف، تفاوت در نوع نمونه‌ها، تعداد نمونه‌ها و شرایط جغرافیایی می‌باشد. به نظر می‌رسد دلیل افزایش سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به تتراسایکلین تجویز و مصرف بیش از حد این آنتی-بیوتیک می‌باشد(۱۳).

ژن Tet M فراوان‌ترین ژن مقاومت می‌باشد. زیرا این ژن هم روی کروموزوم و هم روی پلاسمید قرار دارد و از طریق مکانیسم پروتئین‌های حفاظت ریبوزومی نسبت به تتراسایکلین مقاومت ایجاد می‌کند. پس از آن ژن Tet-K بیشترین فراوانی را دارا می‌باشد که روی پلاسمیدهای کوچک واقع شده است و با مکانیسم پروتئین‌های Efflux باعث خروج تتراسایکلین از سلول می شوند و بنابراین با کاهش غلظت درون سلولی دارو باکتری مقاوم می‌شود.

در این مطالعه به بررسی هم‌زمانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین نیز پرداخته شد. ۱۲/۵درصد از سویه‌ها هم دارای ژن Tet-K و هم دارای ژن Tet-M بودند. در تحقیق امانینی (۱۳۹۲)(۸)، ۱۳/۹درصد و در مطالعات Trzcinski(۲۰۰۰)(۱۵) به ترتیب ۴۲ درصد و ۲۱ درصد از سویه‌ها واجد هر دو ژن Tet-K و Tet-M بودند. با توجه به اینکه هر دو ژن Tet-k و Tet-M روی پلاسمید واقع شده-اند(۱۷،۱۶). یکی از دلایل بالا بودن فراوانی هم زمانی این دو ژن، پیوستگی ژنی می‌باشد.

هم‌چنین فراوانی نوع ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم(Resistant) و بینابینی(intermediate) به تتراسایکلین سنجیده شد. فراوانی ژن‌های Tet-M و Tet-K در سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین بیش از سایر ژن‌ها است. در حالی‌که فراوانی ژن Tet-K در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت بینابینی صفر و ژن Tet-M از فراوانی کمی برخوردار است، این مسئله نیز تایید کننده اهمیت ژن های Tet-M و Tet-K در ایجاد سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین می‌باشد(نمودار۲).



نمودار۲ - مقایسه فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در نمونه‌های R و I سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس.

بر اساس استانداردهای ارائه شده از CDC، جهت تعیین مقاومت به تتراسایکلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس علاوه بر استفاده از روش‌های تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و محیط مولر هینتون آگار پیشنهاد می‌شود از روش‌هایی مانند تعیین حداقل غلظت مهارکننده، روش آگار دایلوشن و یا E-test استفاده نمود(۱۸).

کاهش حساسیت سویه‌های این مطالعه به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین شاید به این دلیل باشد که در اهواز از این آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها و سایر عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های دیگر زیاد استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد که انجام تحقیق مشابه در سویه‌های جدا شده از سایر نقاط کشور معیار مناسبی برای بررسی پراکندگی این سویه‌ها باشد.

در نهایت می‌توان نتیجه‌گیری کرد که میزان مقاومت ایجاد شده در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به تتراسایکلین توسط ژن های مختلف ایجاد کننده مقاومت بهاین آنتی بیوتیک با هم متفاوت است.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله مراتب تشکر خویش را از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، ابراز می‌داریم.

منابع مورد استفاده

1. Akindele, A.A., Adewuyi, I.K., Adefioye, O.A., 2010. Antibiogram and beta-lactamase production of Staphylococcus aureus isolates from different human clinical specimens in a tertiary health institution in Ile-life. American-Eurasian Journal of scientific research 5(4): 230-233.
2. Mamishi, S., Mahmoudi, S., Bahador, A., Matini, H., Movahedi Z., Sadeghi, R.H., Pourakbari, B., 2015.Emergence of community-acquired methicillin-resistantStaphylococcus aureusin an Iranian referral paediatric hospital. Br J Biomed Sci 72(2):47-51.
3. Syed, R.,Prased, G., Debba, F., 2011. Antibiotic drug resistance of hospital acquired staphylococcusaureous in andra Pradesh: A monitoring study. African Journal of Microbiology Research 5(6):671-674.
4. Patton, M.L., Guilday, R.E., Stair-Buchmann, M.E., Reigart, C.L., Young, C., Ackerman, B.H., 2015. Antimicrobial selection in the face of nasal methicillin-resistantStaphylococcus aureus polymerase chain recombination testing in thermal injury patients. J Burn Care Res14: 38-42.
5. Sina, H., Ahoyo, T.A., Moussaoui, W., 2013. Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of staphylococcus aureus strains isolated from skin, softtissue and bone related infections. BMC Microbial 8:13-18.
6. Chaptini, C., Quinn, S., Marshman G., 2015. Methicillin-resistantStaphylococcus aureusin children with atopic dermatitis from 1999 to 2014: A longitudinal study. Australas J Dermatol14: 83-90.
7. Tosh, P.K., Agolory, S.,Strong, B.L., 2013. Prevalence and risk factors associated resistance, characteristics and carriage of the panton-valentine leukoeidinegane. Int J Infect Dis 3(7): 112-117.
8. Adebayo,O., Shittu, L., 2006. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of Staphylococcus aureus in kwazalu-Natal province, South Africa. BMC Infectious Diseases 6:125.
9. Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS MicrobiolLett 245(2): 195-203.
10. Katzung, M., Bertram,G., Susan,B., Antony,J., 2012. Basic and clinical pharmacology. 12thed; 7:998-1025.
11. Emaneini, M., Bigverdi, R., Kalantar, D., Soroush, S., 2013. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzyme in Staphylococcus aureus strains isolated from a burn center. Annals of Burns and Fire Disaster 2(4): 11-15.
12. Ahmadi, Z., Tajbakhsh, E., Momtaz, H., 2013. Determinationof antibiotic resistance in Staphylococcus aureus strainsisolated fromclinical samples from Imam Reza Hospital in Kermanshah. World of Microbes Journal 6(4): 299-311.
13. Moniri, R., Shafiei, M., 2009. Molecular characterization and antibiotic susceptibility pattern of methicillin resistant S.aureus (MRSA) in Tertiary care hospital. Zanjan Medical Journal 16(64): 73-82.
14. Ullah, F., Malik, S., Ahmed, J., 2012. Investigation of the genetic basis of tetracycline resistance in staphylococcus aureus from Pakistan. Topical Journal of Pharmaceutical Research 11(6): 925-931.

15. Trzcinski, K., Cooper, B.S., Hryniewicz, W., Dowson, C.G., 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 45(6): 763-770.
16. Speer, B.S., Shoemaker, N.B., Salyers, A.A., 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. Clin Microbiol Rev 5(4): 387-399.
17. Schmitz, F., Krey, A., Sadurski, R., 2001. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European staphylococcus aureus isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47: 239-246.
18. CDC., 2000. From the centers for disease control and prevention. Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin–Illions. JAMA 283 (5): 597-598.