تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
ازکمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به روش های فنوتیپی و ملکولی در جدایه های بالینی

زینب زارع
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران

کاوس صلح جو
استادیار انگل شناسی پزشکی، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

محمد جواد نوروز نژاد
مربی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران

اکبر کاظمی
مربی میکروبشناسی پزشکی، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

نویسنده مسئول: کاوس صلح جو

پست الکترونیک:solhiouk@yahoo.com

تلفن: ٥٤٣٤١٥٠١

آدرس: گروه میکرو بشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، ایران

دریافت:۹۲/٦/۱۲
ویرایش پایانی: ۹۲/۹/۳
پذیرش: ۹۲/۹/٥

چکیده

زمینه و هدف: *شیوع روز افزون سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) به همراه توانایی این باکتری در ایجاد مقاومت چند دارویی، درمان عفونت های ناشی از این باکتری را با مشکل همراه ساخته است. بنابراین شناسایی و تعیین فراوانی سویه های MRSA به روش های فنوتیپی و ملکولی در مناطق ضروری به نظر می رسد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۱۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های مختلف بالینی از بیمارستان های شیراز و جهرم جمع آوری و برای شناسایی سویه های مقاوم به متی سیلین از روش های فنوتیپی انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به روش E-test و روش ملکولی PCR برای ژن mecA استفاده شد.*

یافته ها: *فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در روش های انتشار دیسک و E-test مشابه و ۶۳ مورد (۴۲٪) مشاهده شد. در حالی که در روش PCR، علاوه بر ۶۳ مورد، ۹ جدایه حساس به اگزاسیلین با روش های انتشار دیسک و E-test، نیز دارای ژن mecA بودند و در کل ۷۲ جدایه (۴۸٪) دارای ژن مقاومت به متی سیلین بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج روش های فنوتیپی و ملکولی نشان داد که فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در این منطقه نسبتاً بالاست و با استفاده از روش های دقیق و حساسی همانند PCR می توان سویه های MRSA را به سرعت شناسایی و در جهت تعیین آنتی بیوتیک های موثر اقدام نمود.*

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، MRSA ، ژن mecA، PCR*

آدرس مقاله
زارع ز، صلح جو ک، نوروز نژاد م ج، کاظمی ا" شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به روش های فنوتیپی و ملکولی در جدایه های بالینی" مجله علوم آزمایشگاهی، ویژه نامه مقاومت دارویی در میکرو ارگانیسم ها، دوره هشتم(شماره ۴) ۷-۱۳

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس(*Staphylococcus aureus*) یکی از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی در دنیا است و در سال های اخیر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین(Methicillin Resistant Staphylococcus aureus = MRSA) از مشکلات مهم بالینی در بیمارستان ها به شمار می آید. اولین مورد MRSA در سال ۱۹۶۱، یعنی یکسال پس از استفاده از آنتی بیوتیک متی سیلین گزارش شد (۲،۱). این باکتری می تواند طیف وسیعی از بیماری ها همچون پنومونی، عفونت های پوستی، التهاب استخوان و اندوکاردیت را ایجاد کند(۳). در سال های اخیر استفاده از آنتی بیوتیک های مختلف منجر به ظهور مقاومت چندگانه در سویه های MRSA شده است. به طوری که این ویژگی در نتیجه جهش در ژن کد کننده ی پروتئین های هدف و از طریق اکتساب و تجمع آنتی بیوتیک در بین باکتری ها منتقل می شود(۴). مقاومت به متی سیلین به وسیله ی یک قطعه ی کروموزومی تحت عنوان Staphylococcal Cassette SCCmec (Chromosome mec) منتقل می شود(۵،۶). این قطعه کروموزمی حاوی ژن *mecA* است و پروتئینی تحت عنوان PBP2a (Penicillin Binding protein) تولید می کند که تمایل اتصالی بسیار ضعیفی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام دارد و توسط این داروها مهار نمی شود (۸،۷). امروزه سویه های MRSA مقاومت چند گانه ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها، آمینو گلیکوزید ها، تتراسایکلین ها، فلوروکوئینون و ماکرولید ها کسب کرده اند و فقط تعداد محدودی از آنتی بیوتیک ها به عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومایسین(Vancomycin) و تیکوپلانین(Teicoplanine) برای درمان استفاده می شوند(۴). در حال حاضر از روش معمول آزمایشگاهی انتشار دیسک برای شناسایی سویه های MRSA استفاده می شود. در حالی که استفاده از روش های دقیق و حساسی همانند PCR می تواند در شناسایی سریع سویه های MRSA و تعیین آنتی بیوتیک های موثر، مفید باشد(۹). درصد فراوانی سویه های MRSA در ایران با روش انتشار دیسک تا ۶۰ درصد و با روش PCR تا ۹۰ درصد گزارش شده است(۱۰-۱۱). تحقیقات انجام شده در سایر نقاط جهان نیز نشان از افزایش سال به سال این سویه ها دارند. به طوری که فراوانی سویه های MRSA در اروپا ۲۰ درصد، در امریکای شمالی بیش ۵۰ درصد و در کشورهای آسیایی نظیر چین، کره و تایوان بیش از ۷۰ درصد است(۱۲-۱۶). با توجه به گزارش های متعدد از وجود سویه های MRSA در مناطق مختلف کشور و لزوم شناسایی سریع و دقیق عفونت های ناشی از MRSA برای شروع درمان موثر، این تحقیق با هدف شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به روش های فنوتیپی و ملکولی در نمونه های بیماران انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، از اردیبهشت تا اسفند ۱۳۹۱، تعداد ۱۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از بخش های مختلف بیمارستان های جهرم (پیمانه و مطهری) و شیراز (شهید فقیهی، MRI و علی اصغر) و با همکاری آزمایشگاه های بیمارستان ها جمع آوری گردید. این جدایه ها از نمونه های خون، ادرار، پوست، سوآب بینی، آبسه های زیر بغل، مایع نخاعی و خلط جدا شدند. پس از تعیین هویت سویه ها با استفاده از آزمون های استاندارد بیوشیمیایی و میکروب شناسی مانند رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر مانیتول و DNase، در ۷۰- درجه ی سانتی گراد برای انجام مراحل بعدی نگهداری شدند(۱۷). تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش کربی– بار (Kirby-Bure) انجام شد. برای این منظور سوسپانسیون باکتری با کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و دیسک های آنتی بیوتیکی (شرکت MAST، انگلستان) شامل اگزاسیلین (۱Mg)، تیکوپلانین (۳۰Mg)، آمپی سیلین (۱۰Mg)، پنی سیلین (۱۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، تتراسایکلین (۵۰µg)، آموکسی سیلین (۲۵µg)، ریفامپین (۵µg)، اریترومایسین (۱۵µg)، کلیندامایسین (۲µg) بر روی محیط کشت قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC۲۵۹۳۲ به عنوان کنترل استفاده شده است. قطر هتاله عدم رشد بر اساس

دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) بررسی و نتایج به صورت حساس (S) و مقاوم (R) ثبت شدند (۱۸). برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، از نوارهای E-test اگزاسیلین شرکت Liofilchem ایتالیا استفاده شد و مطابق با روش کار شرکت سازنده، پلیت های مولر هینتون آگار با باکتری با کدورت نیم مک فارلند تلقیح شد و سپس نوارهای E-test بر روی پلیت قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، MIC اگزاسیلین هر سویه ثبت گردید. سویه های دارای MIC اگزاسیلین کمتر یا مساوی با ۲ میکروگرم بر میلی لیتر حساس، بیشتر یا مساوی با ۴ میکروگرم بر میلی لیتر مقاوم و ما بین این محدوده نیمه حساس به اگزاسیلین شناخته شدند. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC۲۵۹۳۲ به عنوان کنترل استفاده شد (۱۸). با استفاده از کیت های استخراج DNA شرکت سیناژن، DNA از کشت تازه باکتری، استخراج و برای انجام PCR استفاده شد. واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر درون تیوب های آماده PCR Master Mix شرکت BIONEER، با استفاده ازپرایمرهای اختصاصی MecA147-F و MecA147-R (جدول۱) انجام شد. واکنش PCR پس از ۵ دقیقه در دمای ^{o}C ۹۴ دناتوراسیون اولیه (denaturation Initial)، شامل ۳۰ سیکل تحت شرایط ۶۰ ثانیه در دمای ^{o}C ۹۴ مرحله دناتوراسیون (denaturation) ، ۶۰ ثانیه در دمای ^{o}C ۵۰ مرحله اتصال پرایمر (annealing) و ۹۰ ثانیه در دمای ^{o}C ۷۲ مرحله طویل شدن(extension) بود که در نهایت با ۱۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۷۲ طویل شدن نهایی(Final extension) جهت تکثیر قطعه هدف استفاده شد. سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و در دستگاه ترانس لومیناتور زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفت(۱۹). داده ها ی حاصل از تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵/۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده های با $P<0/5$ از نظر آماری، معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول-۱توالی پرایمرهای ژن *mecA*

Primer	Oligonucleotide sequence (5-3)	Amplicon size (bp)
MecA147-F	GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT	۱٤۷
MecA147-R	ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T	

یافته ها

از ۱۵۰ جدایه مورد بررسی، ۹۳ نمونه از افراد مذکر (۶۲٪) و ۵۷ نمونه از افراد مونث (۳۸٪) جداسازی گردید. میانگین سنی بیماران۷ /۳۱±۴۴/۳۸ سال بود. میزان مقاومت ۱۵۰ جدایه ی *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به ۱۰ آنتی بیوتیک متداول بررسی شد (جدول۲). در ۴۲ درصد از جدایه ها (۶۳ جدایه) مقاومت به متی سیلین مشاهده شد. بیشترین درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به پنی سیلین (۹۴٪) و آموکسی سیلین (۹۲٪) و کمترین درصد فراوانی مربوط به تیکوپلانین (۱/۳٪) بود در کل موارد نیمه حساس مشاهده نشد.نتایج روش E-test برای تعیین MIC اگزاسیلین جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که ۶۳ جدایه (۴۲٪) مقاوم، ۶۹ جدایه (۴۶٪) نیمه حساس و ۱۸ جدایه (۱۲٪) ژل آگاروز دارای باندی در حدود ۱۴۷bp بودند و به معنای وجود ژن *mecA* در این جدایه ها بود و ۷۸ جدایه (۵۲٪) فاقد

بحث

تجویز آنتی بیوتیک های غیر ضروری به جای درمان صحیح، سطح مقاومت دارویی را در افراد مبتلا به عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش داده است و به دنبال آن بدلیل توانایی ایجاد مقاومت چند دارویی، درمان عفونت های ناشی از این باکتری را با مشکل همراه ساخته است(۹). بنابراین داشتن اطلاعات دقیق از درصد شیوع سویه های MRSA در هر منطقه ضروری به نظر می رسد. تحقیق حاضر که با هدف شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در بین جدایه های بالینی بیمارستان های شیراز و جهرم انجام شد نشان داد که فراوانی این سویه ها با روش انتشار این ژن بودند.

جدول۱-درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش انتشاردیسک

آنتی بیوتیک	مقاوم	حساس
اگزاسیلین	۶۳ (٪۴۲/۰)	۸۲ (٪۵۸/۰)
تیکوپلانین	۲ (٪۱/۴)	۱۴۸ (٪۹۸/۶)
تتراسیکلین	۶۴(٪۴۲/۷)	۸۶(٪۵۷/۳)
اریترومایسین	۲۰(٪۳۱/۳)	۱۳۰(٪۸۶/۶)
کلیندامایسین	۱۲(٪۸/۷)	۱۳۸(٪۹۲/۰)
سیپروفلوکساسین	۳۵(٪۲۳/۳)	۱۱۵(٪۶۷/۶)
پنی سیلین	۱۴۱(۹۴/۰)	۹(٪۶/۰)
آمپی سیلین	۱۲۳(٪۸۲/۰)	۲۷(٪۱۸/۰)
آموکسی سیلین	۱۳۸(٪۹۲/۰)	۱۲(٪۸/۰)
ریفامپین	۲۴(٪۱۶/۰)	۱۲۶(٪۸۴/۰)
ونکومایسین	۲ (٪۱/۴)	۱۴۸ (٪۹۸/۶)

دیسک و E-test، ۴۲ درصد و با روش PCR، ۴۸ درصد بود اگر چه تفاوت اندکی در نتایج این روش ها مشاهده شد اما از نظر آماری معنی دار نبود. فراوانی سویه های MRSA به روش فنوتیپی در شهرهای مختلف ایران بررسی شده است. به طوری که این درصد در تهران ۵۰-۳۰ درصد (۲۰-۲۳)، شهر کرد ۴۴ درصد(۲۴)، اهواز ۶۰ درصد(۱۰)، بوشهر ۵۹/۷۲ درصد(۲۵)، کرمانشاه ۳۱/۴ درصد(۲۶)، شیراز ۴۳ درصد (۲۷) و استان گلستان ۳۶/۲ درصد (۲۸)گزارش شده است. در مطالعه عسکری و همکاران در سال ۲۰۱۲ که بصورت مرور سیستماتیک و متا آنالیز جهت بررسی اپیدمیولوژی *استافیلوکوکوس اورئوس* های حاوی ژن *mecA* در ایران انجام شد، مشخص گردید که سویه های MRSA در اکثر شهرهای ایران (اهواز، فلاورجان، فسا، سنندج، گرگان، کاشان، اصفهان، تهران، مشهد، شهرکرد، همدان، شیراز، تنکابن و همدان) شیوع دارد. به طوری که کمترین فراوانی از اصفهان(٪۲۰/۴۸) و بیشترین فراوانی از تهران (٪۹۰)گزارش شده است و به طور میانگین ۵۲/۷ درصد از سویه ها در ایران حاوی ژن *mecA* بوده اند(۱۱). بنابراین درصد فراوانی سویه های MRSA در این منطقه در مقایسه با نقاط دیگر کشور نسبتاً بالا می باشد و نزدیک به میانگین فراوانی در کل ایران است. مقایسه روش های فنوتیپی و ملکولی در این تحقیق نشان داد که از ۷۲ جدایه (٪۴۸) دارای ژن *mecA* در روش PCR، فقط ۶۳ جدایه (٪۴۲) با روش های فنوتیپی مقاوم به متی سیلین بودند. در حالی که فراوانی سویه ها با روش انتشار دیسک و PCR به ترتیب در مطالعه ی نجار پیرایه و همکاران (۲۰) ۵۰ درصد و ۴۸/۲ درصد، در مطالعه عظیمیان و همکاران(۲۲) ۴۶ درصد و ۴۷درصد، در مطالعه رحیمی و همکاران(۲۳) یکسان و برابر با ۳۰ درصد، در مطالعه نفیسی و همکاران(۲۴) ۴۴ درصد و ۵۲ درصد و در مطالعه مهاجری و همکاران(۲۶) ۳۱/۴ درصد و ۵۰ درصد گزارش شده است. بررسی این نتایج نشان می دهد که در اکثر این تحقیقات، مشابه با تحقیق حاضر، درصد فراوانی فنوتیپی از نتایج مولکولی کمتر و یا بسیار نزدیک است. یکی از دلایل تفاوت در نتایج روش های فنوتیپی و ملکولی وجود سویه های با مقاومت هتروژن می باشد که می تواند منجر به نتایج منفی کاذب شود. از طرفی روش انتشار دیسک ممکن است به دلایلی همچون مقدار باکتری تلقیحی، قطر محیط کشت و دیسک های مورد استفاده، نتایج منفی و یا مثبت کاذب داشته باشد(۳۰،۲۹). و از آنجایی که ژن *mecA* در سویه های *استافیلوکوک* حساس به متی سیلین یافت نمی شود (۳۱) بنابراین روش مولکولی PCR که ژن *mecA* را شناسایی می کند، روش استاندارد طلایی برای شناسایی سویه های MRSA محسوب می شود(۳۲،۳۱) و بهتر است با وجود داشتن هزینه ی بیشتر جایگزین روش های فنوتیپی متداول آزمایشگاهی شود. نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که سویه های MRSA، نسبت به آنتی بیوتیک های رایج مقاومت نسبتاً بالایی دارند و مقاومت چندگانه در بین سویه وجود دارد اما هنوز حساسیت بالایی (٪۹۸) نسبت به آنتی بیوتیک های وانکومایسین و تیکوپلانین در بین این جدایه ها دیده می شود و این می تواند به علت مصرف

کمتر این آنتی بیوتیک ها در ایران باشد. بنابراین می توان از آنها به عنوان موثرترین دارو برای درمان عفونت های استافیلوکوکی استفاده نمود.

نتیجه گیری

نتایج روش های فنوتیپی و موکولی نشان داد که درصد فراوانی سویه های MRSA در این منطقه در مقایسه با نقاط دیـگر کشور نسبتاً بالا می بـاشد و به نظر می رسد که با استفاده از روش های دقیق و حساسی همانند PCR می توان سویه های MRSA را به سرعت شناسایی و در جهت تعیین و انتخاب آنتی بیوتیک های موثر اقدام نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم بخاطر حمایت مالی از این تحقیق(کد طرح تحقیقاتی ۷۰/۹۰) صمیمانه تقدیر و تشکر می نمایند.

References

1. 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*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(4): 1147-52.

2.Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U. *Methicillin resistant Staphylococcus aureus containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006*. J Antimicrob Chemother. 2007; 60(6):1258-63.

3. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. *Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1998; 36(3): 618-23.

4. Chambers HF. *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(4): 781-91.

5. Martins A, Cunha Mde L. *Methicillin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects*. Microbiol Immunol. 2007; 51(9): 787-95.

6. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. *Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2005; 43(10): 5026-33.

7. Krishnan PU, Miles K, Shetty N. *Detection of methicillin and mupirocin resistance in Staphylococcus aureus isolates using conventional and molecular methods: a descriptive study from a burns unit with high prevalence of MRSA*. J Clin Pathol. 2002; 55(10): 745-8.

8. Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill F 3rd. *Comparison of susceptibility testing methods with mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcus spp*. J Clin Microbiol. 1999; 37(9): 2952-61.

9. Naimi TS, Anderson D, O'Boyle C, Boxrud DJ, Johnson SK, Tenover FC, et al. *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus with phenotypic susceptibility to methicillin in a patient with recurrent bacteremia*. Clin Infect Dis. 2003; 36(12): 1609-12.

10. Ekrami A, Samarbafzadeh A, Alavi M, Kalantar E, Hamzeloi F. *Prevalence of methicillin resistant Staphylococcus species isolated from burn patients in a burn center, Ahvaz, Iran*. Jundishapur Journal of Microbiology. 2010; 3(2): 84-91.

11. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, Naderi Nasab M .*Epidemiology of mecA-Methicillin Resistant Staphylococcus aureus in Iran: A Systematic Review and Meta-analysis.* Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2012; 15(5): 1010-1019.

12. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999-2002*. Emerg Infect Dis. 2004; 10(9): 1627-34.

13. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. *data summary from January 1992 through Jane 2004*. Am J Infect Control. 2004; 32: 470-85.

14. Wang JT, Chen YC, Yang TL, Chang SC. *Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Taiwan*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 42(3): 199-203.

15. Aires de Sousa M, Crisóstomo MI, Sanches IS, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A, et al. *Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant Staphylococcus aureus from patients in two hospitals in Taiwan and China.* J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 159-63.

16. Kim HB, Park WB, Lee KD, Choi YJ, Park SW, Oh MD, et al. *Nationwide surveillance for Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Korea*. J Clin Microbiol 2003; 41(6): 2279-81.

17. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scotts Diagnostic microbiology*. 12th ed. USA; Elsevier. 2007; 172-213.

18. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (2002), 16th International supplement*. CLSI document M100-S12, vol.22.No.1.Pennsylvania, USA.

19. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. *Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction*. J Clin Microbiol. 1991; 29(10): 2240-44.

20. Najar-Peerayeh S, Azimian A, Mostafaee M, Siadat SD. *Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by disk diffusion method, determination of MIC, and PCR for mecA Gene*. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology, 2009; 12(3): 61-69.[Persian]

21. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, et al. *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in Tehran, Iran*. Microb Drug Resist. 2008; 14(3): 217-20.

22. Azimian A, Najar-Peerayeh S, Mirab-Samiee S, Naderi M. *Occurrence of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among clinical samples in tehran-iran and its*

correlation with polymorphism of specific accessory gene regulator (AGR) groups. Braz J Microbiol. 2012; 43(2):779-785.

23. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. *Antibiotic Resistance Pattern of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus Isolates in Tehran, Iran*. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(2): 144-149.

24. Nafisi M, Kalhor H, Zamanzad B, Karimi A, Farokhi E, Validi M. *Comparison of agar screen and duplex-PCR in determination of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-kord, 2007.* Arak University of Medical Sciences Journal. 2008; 11(2): 94-101.[Persian]

25. Gharibi O, Mirzaei K, Zakerhussaini M, Darabi H, Farzaneh MR, Karimi A, et al. *Prevalence of methicillin – resistant Staphylococcus aureus at the Hospital of the medical University of Bushehr in Iran.* African Journal of Microbiology Research. 2012; 6(23): 5035-5038.

26. Mohajeri P, Izadi B, Rezaei M, & Farahani A. *Frequency Distribution of Hospital-Acquired MRSA Nasal Carriage Among Hospitalized Patients in West of Iran*. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013; 6(6): e9076.

27. Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasoli M, Farshad S. *Distribution patterns of methicillin resistance genes (mecA) in Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens*. Iran Biomed J. 2004; 8(4): 173-8.

28. Vaez H, Tabaraei A, Moradi A, Ghaemi EA. *Evaluation of methicillin resistance Staphylococcus aureus isolated from patients in Golestan province-north of Iran*. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5(4): 432-436.

29. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. *Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test*. J Clin Microbiol. 2002; 40(8): 2766-71.

30. Kampf G, Adena S, Rüden H, Weist K. *Inducibility and potential role of MecA-gene positive oxacillin-susceptible Staphylococcus aureus from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections*. J Hosp infect. 2003; 54(2): 124-9.

31. Wallet F, Roussel-Devallez M, Courcol RJ. *Choice of a routine method for detecting methicillin-resistance in staphylococci.* J Antimicrob Chemother. 1996; 37(5): 901-9.

32. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. *Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* J Antimicrob Chemother. 2005; 56(6):1000-18.

Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* by Phenotypical and Molecular Methods among Clinical Isolates

Zare, Z. (MSc)
MSc of Microbiology, Depatment of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Solhjoo, K. (PhD)
Assistant Professor of Medical Parasitology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Norooznejad, MJ. (MSc)
Instructor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Kazemi, A. (MSc)
Instructor of Medical Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Corresponding Author:
Solhjoo, K.

Email:
solhjouk@yahoo.com

Received: 3 Sep 2013
Revised: 24 Nov 2013
Accepted: 30 Dec 2013

Abstract

Background and Objective: Increasing prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) with their multidrug resistance potential causes difficulties in the treatment of infections due to these bacteria. Hence, the detection and determination of the frequency of MRSA strains via phenotypical and molecular methods is necessary in different parts of the county.

Material and Methods: In this cross- sectional study, 150 *Staphylococcus aureus* strains were collected from different clinical samples in the hospitals located in Shiraz and Jahrom, Iran. To detect methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains, we used phenotypical methods such as disc diffusion and minimum inhibitory concentration by E-Test, and PCR molecular method for *mass* gene.

Results: The frequency of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* was 63 strains (42%) using disc diffusion and E-Test. while in PCR method, in addition to 63 strains, nine other isolates, which were sensitive to oxacillin by disc diffusion and E-Test, possessed also *mecA* gene. By and large, 72 isolates (48%) had methicillin resistance gene.

Conclusion: Given the results of phenotypical and molecular methods, the frequency of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* was relatively high in this area. Thus, the MRSA strains can be detectable as soon as possible by accurate and sensitive methods such as PCR to determinate the effective antibiotics.

Keywords: Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*, MRSA, *MecA* Gene, PCR

This paper should be cited as: Zare Z, Solhjoo K, Norooznejad MJ, Kazemi A. [Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by Phenotypical and Molecular Methods among Clinical Isolates]. mljgoums. 2014; 7-13(Suppl 4): [Article in Persian]