مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۵۱/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۳

مقایسه‌ی نتایج روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) و اگزاسیلین آگار دایلوشن در تعیین مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از بیمارستان الزهرای اصفهان

دکتر سید اصغر هوایی[۱]، محسن کربلایی زاده بابکی[۲]، دکتر ابتهاج پیشوا[۱]

چکیده

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری‌های مهم عفونی است و بیماری‌زایی این باکتری در جامعه و بیمارستان از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. این باکتری قسمتی از فلور نرمال انسان بوده که در مجاری تنفسی فوقانی ۲۵ درصد افراد سالم وجود دارد و باعث طیف وسیعی از بیماری‌ها، از عفونت‌های پوستی تا عفونت‌های بسیار شدید و مهاجم شامل سپتیسمی، اندوکاردیت، پنومونی و آبسه‌های عمیق پوستی می‌شود. استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت‌های شدید بیمارستانی و جامعه است. در این بین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین این باکتری شیوع مرگ و میر بالایی دارند. بنابراین برای کنترل عفونت‌های بیمارستانی باید درصد شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین را به سرعت شناسایی و اقدامات درمانی را برای کنترل این عفونت‌ها انجام داد.

روش‌ها: ۱۱۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مختلف بالینی موجود در بیمارستان الزهرا (س) جدا شد. حداقل غلظت مهار کنندگی اگزاسیلین (MIC) با روش آگار دایلوشن برای سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین تعیین و PCR برای ژن‌های mecA انجام گرفت.

یافته‌ها: از بین ۱۱۴ نمونه گرفته شده، ۳۵ نمونه دارای ژن mecA بودند که به وسیله روش آگار دایلوشن مورد بررسی قرار گرفتند. حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) در روش آگار دایلوشن برای اگزاسیلین طبق قوانین CLSI، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و نتایج ثبت شد. سپس برای تمامی سویه‌ها PCR ژن mecA انجام شد و نتایج با روش آگار دایلوشن مقایسه گردید. در بین سویه‌های مقاوم، ۴ درصد دارای ژن mecA بوده که در روش فنوتیپی بیان نشده بود و این سویه‌ها حساس به متی‌سیلین بودند. سپس PCR برای ژن‌های mecA انجام شد.

نتیجه‌گیری: روش آگار دایلوشن برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به روش دیسک دیفیوژن از حساسیت بیشتری برخوردار بود. با این وجود، روش PCR بهترین روش برای شناسایی سویه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین می‌باشد. از آن جایی که بعضی از سویه‌ها در آزمایش‌های فنوتیپی نسبت به اگزاسیلین حساس بوده، ولی دارای ژن mecA بودند؛ ژن mecA آن‌ها توسط PCR مورد شناسایی قرار گرفت.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن mecA، سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus areus)، از باکتری‌های کوکسی شکل گرم مثبت بوده که در همه جا پراکنده هستند و اغلب بر روی پوست و غشاهای مخاطی حضور دارند. کلمه Staphyl به معنای خوشه انگور می‌باشد؛ چرا که آرایش قرار گرفتن این کوکسی‌ها به صورت خوشه‌ای شکل در کنار یکدیگر می‌باشد. استافیلوکوکوس اورئوس از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی عفونت‌های اکتسابی بیمارستان می‌باشد (۴-۱).

سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس که با نام MRSA یا (Methicillin resistant staphylococcus aureus

---

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

[۱] دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: محسن کربلایی زاده بابکی
Email: mohsenkarbalaei@ymail.com

www.mui.ac.ir

شناخته می‌شوند، تهدید جدی در عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آیند و روند درمان عفونت‌های این باکتری را با مشکل مواجه می‌سازند. حدود یک سال پس از معرفی متی‌سیلین در سال ۱۹۶۱، بروز سویه‌های MRSA از بیمارستان‌های مختلف دنیا به خصوص بیمارستان‌های اروپایی گزارش شد (۶-۵). اکنون این سویه‌ها در تمام دنیا پخش شده‌اند.

متی‌سیلین، پنی‌سیلین نیمه مصنوعی و نسبت به آنزیم‌های پنی‌سیلیناز مقاوم می‌باشد. مقاومت سویه‌های MRSA در مقابل متی‌سیلین مربوط به تولید نوعی پروتئین از دیواره‌ی سلولی آن به نام PBP2a می‌باشد. این پروتئین تمایل اتصال بسیار ضعیفی با آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی دارد. این پروتئین توسط ژن mecA که در کروموزوم باکتری مقاوم قرار دارد، کدگذاری می‌شود (۸-۷).

سویه‌های MRSA اغلب به طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی مثل داروهای بتالاکتام، تتراسایکلین، ماکرولید، آمینوگلیکوزیدها و کینولون‌ها (Quinolones) مقاوم هستند و در محیط بیمارستان کولونیزه می‌شوند (۹).

بعضی از آن‌ها به سرعت می‌توانند در داخل بیمارستان گسترش یابند. انتشار این سویه‌ها که به آن‌ها MRSA اپیدمیک (EMRSA) اطلاق می‌شود، به علت ریشه‌کنی سخت بعد از استقرار در بخش، محدودیت در انتخاب دارو و هزینه‌ی بالای درمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (۹). این باکتری‌ها قادر به ایجاد عفونت‌های بیمارستانی زیادی، به خصوص آندوکاردیت و باکتریمی می‌باشند (۱۱-۱۰).

در تحقیق حاضر، فراوانی MRSAها با سه روش انتشار دیسک (Disk diffusion)، تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) و یا به روش آگار دایلوشن (Agar dilution) PCR برای ژن mecA در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی بررسی شد.

روش‌ها

۱- نمونه‌ها

۱۱۴ استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان الزهرای شهر اصفهان جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها عبارت از: نمونه‌های پوستی ۲۸/۰۷ درصد (۳۲ نمونه)، خونی ۱۹/۲۹ درصد (۲۲ نمونه)، ریوی ۲۸/۹۵ درصد (۳۳ نمونه)، ادراری ۹/۶۵ درصد (۱۱ نمونه)، سینوویال ۲/۶۳ درصد (۳ نمونه) و سایر قسمت‌ها ۱۱/۴۱ درصد (۱۳ نمونه) بودند که پس از جمع‌آوری، توسط محیط کشت بلاد آگار به آزمایشگاه انتقال داده شدند و تشخیص قطعی آن توسط آزمایش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

این باکتری کوکسی گرم مثبت، کاتالاز مثبت و DNase مثبت می‌باشد. تولید کواگولاز نیز توسط پلاسمای سیتراته خرگوش به روش لوله‌ای تأیید شد. پس از کشت در محیط مانیتول سالت آگار و رشد آن پس از ۲۴ ساعت، تشخیص نهایی صورت گرفت. برای نگهداری نمونه‌ها، محیط مایع تریپتیکاز سوی (TSB) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول به عنوان نگهدارنده استفاده شد و سپس نمونه‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

۲- تعیین حساسیت نسبت به متی‌سیلین

برای اطمینان بیشتر، حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک متی‌سیلین توسط روش Agar screen تعیین

www.mui.ac.ir

شد. در این روش نیز همانند روش دیسک دیفیوژن از کشت تازه‌ی ۲۴ ساعته استفاده گردید. بدین ترتیب که پس از تهیه‌ی پودر اگزاسیلین (Sigma)، این دارو بر طبق فرمول زیر به میزان مشخص به محیط مولر هینتون آگار اضافه گردید. محیط مولر هینتون مورد استفاده در این روش دارای ۴ درصد NaCl و همچنین ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر پودر اگزاسیلین بود (۲۸-۱۳).

$$\text{Weight(mg)} = \frac{volume(ml) \times concentration\ (\mu g / ml)}{potency(\mu g / mg)}$$

۳- تعیین MIC برای متی‌سیلین

روش آگار دایلوشن برای انجام MIC استفاده شد و محیط مولر هینتون آگار دارای ۴ درصد NaCl حاوی غلظت‌های متوالی از اگزاسیلین (Sigma) بود. از کشت تازه‌ی ۲۴ ساعته در محیط بلاد آگار، سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید و در هر قطره با غلظت نهایی 10^4 CFU در محیط مولر هینتون که اگزاسیلین در آن فیلتر شده بود، کشت داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و کنترل مثبت و منفی همانند روش آگار اسکرین مورد استفاده قرار گرفت (۲۳-۱۴).

۴- استخراج DNA باکتری

۱/۵ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری‌ها در محیط TSB را در داخل میکروتیوپ ریخته و به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از اضافه کردن بافرهای TE و لیزوزیم و نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، بافر لیز کننده و پروتئیناز K را نیز به آن اضافه کرده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت نگهداری شد. سپس DNA به روش مرسوم فنل کلروفورم استخراج گردید (۲۷).

۵- PCR برای شناسایی ژن mecA

برای انجام PCR از پرایمرهای مشخص شده توسط مقالات موجود استفاده شد.

برای ژن mecA، PCR با میزان ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۴ میکرولیتر DNTP، ۰/۶ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز برای هر نمونه به همراه ۵ میکرولیتر از هر نمونه که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می‌رسید.

برای ژن mecA برنامه‌ی دمایی شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه که با ۳۰ سیکل شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه دنبال شد. مدت زمان طویل شدن نهایی نیز ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. از ژل آگارز ۱ درصد برای مشخص کردن ژن mecA با وزن مولکولی ۳۱۰ bp استفاده گردید (۱۲).

جدول ۱. توالی پرایمر

نام پرایمر	توالی پرایمر
mecA	F: 5´TGGCTATCGTGTCACAATCG 3´ R: 5´CTGGAACTTGTTGAGCAGAG 3´

یافته‌ها

۱- نتایج آگار اسکرینینگ (Agar screen)

همان طور که ذکر شد، برای اطمینان بیشتر به جای روش دیسک دیفیوژن، روش آگار اسکرین برای جدا کردن استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به

www.mui.ac.ir

متی‌سیلین به کار گرفته شد و برای این منظور از پودر اگزاسیلین ساخت شرکت Sigma استفاده شد. برخلاف وجود ژن mecA در استافیلوکوکوس اورئوس، در بعضی مواقع این ژن بیان نمی‌شود. در این پژوهش نیز تعدادی از استافیلوکوکوس اورئوس‌های دارای ژن mecA در آزمایش آگار اسکرین نسبت به اگزاسیلین حساس بودند.

۲- نتایج MIC توسط روش Agar dilution

پس از آن که نمونه‌های مقاوم (۳۱ نمونه) توسط روش آگار اسکرین شناسایی شدند، میزان MIC این نمونه توسط روش آگار دایلوشن که از مقاله به دست آمده بود، بررسی شد (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج آگار اسکرین

حساس (دارای ژن mecA) نمونه (درصد)	مقاوم (دارای ژن mecA) نمونه (درصد)
۴ (۱۱/۴۳)	۳۱ (۸۸/۵۷)

طبق دستورالعمل CLSI، پایین‌ترین میزان MIC برای نمونه‌های دارای ژن mecA نسبت به اگزاسیلین بیشتر از ۴ میکروگرم و بالاترین میزان MIC نیز بیشتر از ۲۵۶ میکروگرم در نظر گرفته می‌شود (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج MIC به دست آمده از ۳۱ نمونه اسکرین شده

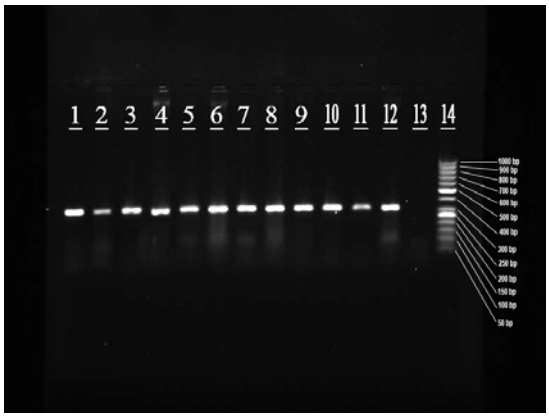
MIC	تعداد نمونه‌ها	درصد نمونه‌ها
۸	۲	۶/۴۵
۱۶	۳	۸/۵۷
۳۲	۴	۱۲/۹۱
۶۴	۳	۹/۶۸
۱۲۸	۶	۱۹/۳۵
۲۵۶	۱۳	۳۷/۱۴

MIC: Minimum inhibitory concentration

۳- نتایج PCR برای ژن mecA

از بین ۱۱۴ نمونه‌ی مورد بررسی که برای تمامی آن‌ها PCR ژن mecA گذاشته شد، تعداد ۳۵ نمونه (حدود ۳۱ درصد) دارای ژن mecA بودند و بقیه نمونه‌ها فاقد این ژن بودند. بر طبق پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق، ژن mecA دارای وزن مولکولی ۳۱۰ bp بود که در شکل زیر با استفاده از مارکر ۵۰ bp نمایش داده شده است.

شکل ۱. آنالیز الکتروفورتیک محصول PCR برای ژن mecA



از سمت چپ به راست:

۱- lane اول کنترل مثبت (ATCC33591)

۲- lane ۲ تا ۱۲، استافیلوکوکوس اورئوس‌های دارای ژن mecA

۳- lane ۱۳ کنترل منفی (آب مقطر)

۴- lane ۱۴ مارکر ۵۰ bp

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به عنوان یک پاتوژن انسانی اصلی در عفونت‌های بیمارستانی (Nosocomial infections) محسوب می‌شود و در بیمارستان‌ها مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در این ارگانیسم به صورت غیر منتظره دیده شده است که منجر به افزایش هزینه و مشکلات درمانی عفونت‌های ایجاد شده به وسیله

www.mui.ac.ir

این پاتوژن می‌گردد.

Cekovska و همکاران در مطالعه‌ای بر روی ۲۱۰ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس، حساسیت به متی‌سیلین را با روش‌های فنوتیپی و PCR تعیین و سه سویه‌ی فاقد ژن mecA را با روش فنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین گزارش نمودند (۱۷).

در تحقیقی که توسط نادری نسب و همکاران انجام شد، ۸۶ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس از نظر مقاومت به متی‌سیلین به دو روش PCR و دیسک دیفیوژن مورد مقایسه قرار گرفتند که از این ۸۶ ایزوله، ۴۶ ایزوله هم به روش PCR و هم به روش دیسک دیفیوژن به متی‌سیلین مقاومت داشتند. از ۴۰ سوشی که mecA منفی بودند ۱۱ مورد (۱۲/۸ درصد) سوش حساسیت، ۲۶ مورد (۳۰/۲ درصد) مقاومت و ۳ مورد (۳/۵ درصد) مقاومت سطح پایین را در روش دیسک دیفیوژن نشان دادند (۲۹).

با توجه به موارد ذکر شده در مورد مقاومت‌های کاذب نسبت به متی‌سیلین و نتایج به دست آمده از آن، در مطالعه‌ی حاضر برای جلوگیری از به دست آمدن نتایج مثبت کاذب، از روش Agar screen برای مشخص کردن قطعی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استفاده شد. اغلب سویه‌های دارای ژن mecA در روش Agar screen نسبت به اگزاسیلین مقاوم و سویه‌های فاقد ژن mecA در روش Agar screen حساس به اگزاسیلین بودند.

در روش Agar screen از بین ۳۵ نمونه‌ی دارای ژن mecA، ۳۱ نمونه مقاوم و تنها ۴ نمونه حساس به اگزاسیلین بودند و همه‌ی نمونه‌های فاقد ژن mecA حساس به اگزاسیلین بودند.

در سال ۲۰۰۴ در اروپا میزان مقاومت به متی‌سیلین ۲۰ درصد و در آمریکا بین ۲۳ تا ۵۵ درصد گزارش شده است (۲۶-۲۵). فراوانی MRSAها در تحقیق رهبر و همکاران ۵۳ درصد و در گزارش فتح الله زاده و همکاران ۳۶ درصد گزارش شد (۳۱-۳۰) و در کشور ترکیه این میزان ۵۱ درصد گزارش شد (۳۲). همچنین میزان MRSAها از بیمارستان نمازی شیراز ۴۳ درصد به دست آمد (۳۳).

مطالعه‌ی حاضر که میزان شیوع ژن mecA را در نمونه‌های جمع‌آوری شده سال ۱۳۸۸ بررسی کرد، حدود ۳۱ درصد نمونه‌ها دارای ژن mecA بودند. از بین این نمونه‌ها ۲۷ درصد آن‌ها در حالت فنوتیپی نیز نسبت به اگزاسیلین از خود مقاومت نشان دادند؛ در حالی که ۴ درصد باقی‌مانده در حالت فنوتیپی نسبت به اگزاسیلین حساس بودند.

در تحقیقی که Perez و همکاران بر روی MIC استافیلوکوکوس اورئوس انجام دادند، MIC > ۴ µg/ml مقاوم به متی‌سیلین و MIC ≤ ۴ µg/ml حساس به متی‌سیلین بودند (۲۳).

در تحقیق Skov و همکاران بر روی MIC استافیلوکوکوس اورئوس نیز MIC > ۴ µg/ml مقاوم به متی‌سیلین و MIC ≤ ۴ µg/ml حساس به متی‌سیلین گزارش شدند (۲۴).

در تحقیق حاضر بر روی MIC استافیلوکوکوس اورئوس نیز، MIC > ۴ µg/ml مقاوم به متی‌سیلین و MIC ≤ ۴ µg/ml حساس به متی‌سیلین بودند.

نتیجه‌گیری

در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن، استفاده از روش‌های دیگر از جمله Agar screen و حتی E-test دقت و حساسیت را به میزان بیشتری افزایش می‌دهد

www.mui.ac.ir

و از پیدایش جواب‌های کاذب تا حدود زیادی جلوگیری می‌کند.

استفاده از روش PCR به عنوان یک روش استاندارد برای ردیابی ژن‌های موجود در یک باکتری استفاده می‌شود. آن چه می‌توان پس از انجام PCR در مورد استافیلوکوکوس اورئوس نتیجه گرفت این است که پس از شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس‌های اپیدمیک و اسپورادیک، باید اقدامات لازم جهت درمان و به خصوص کنترل عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری را -که متأسفانه قسمت اعظمی از عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص داده‌اند- انجام داد.

بنابراین با انجام این گونه تحقیقات می‌توان از مقاومت بیش از اندازه‌ی باکتری و به دنبال آن مصرف بی رویه‌ی داروهای گلیکوپپتیدی (به عنوان آخرین آنتی بیوتیک انتخابی سوش‌های مقاوم به متی‌سیلین) جلوگیری کرده و هزینه‌های درمانی را کاهش داد.

References

1. Crisostomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, de LH. The evolution of methicillin resistance in Staphylococcus aureus: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(17): 9865-70.
2. Simor AE, Ofner-Agostini M, Bryce E, Green K, McGeer A, Mulvey M, et al. The evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Canadian hospitals: 5 years of national surveillance. CMAJ 2001; 165(1): 21-6.
3. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends Microbiol 2001; 9(10): 486-93.
4. 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.
5. Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. Br Med J 1961; 1(5219): 124-5.
6. STEWART GT, HOLT RJ. Evolutio of natural resistance to the newer penicillins. Br Med J 1963; 1(5326): 308-11.
7. Sabath LD, Wallace SJ. The problems of drug-resistant pathogenic bacteria. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Ann N Y Acad Sci 1971; 182: 258-66.
8. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus. J Bacteriol 1984; 158(2): 513-6.
9. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. Braz J Infect Dis 2003; 7(1): 32-43.
10. Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE, Jr., Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, et al. A prospective multicenter study of Staphylococcus aureus bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. Medicine (Baltimore) 2003; 82(5): 322-32.
11. Hookey JV, Edwards V, Cookson BD, Richardson JF. PCR-RFLP analysis of the coagulase gene of Staphylococcus aureus: application to the differentiation of epidemic and sporadic methicillin-resistant strains. J Hosp Infect 1999; 42(3): 205-12.
12. Vannuffel P, Laterre PF, Bouyer M, Gigi J, Vandercam B, Reynaert M, et al. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. J Clin Microbiol 1998; 36(8): 2366-8.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protocols for evaluating dehydrated Mueller-Hinton agar.1996 Approved standard, lst ed. NCCLS document M6-A. Available to URL: http://www.iso90.ir/phocadownload/csli/M06-A.pdf. 2012. Ref Type: Generic
14. PA: Clinical and laboratory standards institute. CLSI (2006a). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved standard, CLSI document M7-A7. Wayne. Available to URL: http://www.iso90.ir/phocadownload/csli/M7-A7.pdf. 2012. Ref Type: Generic
15. Bosgelmez-Tinaz G, Ulusoy S, Aridogan B, Coskun-Ari F. Evaluation of different methods to detect oxacillin resistance in Staphylococcus au-

www.mui.ac.ir

reus and their clinical laboratory utility. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006; 25(6): 410-2.
16. Jana M, Robert Skov, Swenson, Jean B.Patel. The cefoxitin disk test-what a clinical microbiologist needs to know. Clinical microbiology newsletter 2007; 29(5): 33-40.
17. 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. Bratisl Lek Listy 2005; 106(4-5): 163-7.
18. Hhmabindu M, Sugapriya Muthamilselvan, et al. Molecular analysis of coagulase gene polymorphism in clinical isolates of methicilin resistant staphylococcus aureus by restriction fragment length polymorphism based genotyping. American Jornal of Infectious Disease 2009; 5(2): 170-6.
19. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol 1992; 30(7): 1642-5.
20. Schlegelova J, Dendis M, Benedik J, Babak V, Rysanek D. Staphylococcus aureus isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. Vet Microbiol 2003; 92(4): 327-34.
21. Janwithayanuchit I, Paungmoung P, Ngamululert S, Rangsipanuratn W. Epidemiologic study of methicillin-resistant staphylococcus aureus by coagulase gene polymorphism. 127-132. 2006. Ref Type: Generic
22. Kobayashi N, Taniguchi K, Kojima K, Omizu Y, Uehara N, Kurokawa I, et al. Analysis of methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococcus aureus by a molecular typing method based on coagulase gene polymorphisms. Epidemiol Infect 1995; 115(3): 419-26.
23. Perez LRR, Dias C+, d'Azevedo PA. Agar dilution and agar screen with cefoxitin and oxacillin: what is known and what is unknown in detection of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. J Med Microbiol 2008; 57(8): 954-6.
24. Skov R, Smyth R, Larsen AR, Bolmstrom A, Karlsson A, Mills K, et al. Phenotypic detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar. J Clin Microbiol 2006; 44(12): 4395-9.
25. Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Willems RJ, De Neeling AJ. Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic berlin methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone with low-level resistance to oxacillin. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3077-82.
26. Appelbaum PC. MRSA--the tip of the iceberg. Clin Microbiol Infect 2006; 12 Suppl 2: 3-10.
27. Ravinder Kumar, Yadav B.R, Kapil Dev, Singh R.S. A simple protocol for DNA extraction from staphylococcus aureus. Available to URL: http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/A-Simple-Protocol-for-DNA-Extraction-from-Staphylococcus-Aureus-4999.html. 2008Ref Type: Generic
28. Swenson JM, Spargo J, Tenover FC, Ferraro MJ. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3781-4.
29. Naderi Nasab M, Tavakol Afshari J, Nazim M, Fateh Manesh, Khodadust M.A, Faramarzi H. Methicillin-resistant staphylococcus aureus determined by phenotypic methods. Med J Mashad Univ Med Sci 2005; 48(1): 7-16.
30. Rahbar M, Yaghoobi M, Fattahi A. Comparison of different laboratory methods for detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Pak J Med Sci 2006; 22(4): 442-5.
31. 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.
32. Adaleti R, Nakipoglu Y, Karahan ZC, Tasdemir C, Kaya F. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Infect Dev Ctries 2008; 2(1): 46-50.
33. Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasoli M, Farshad S. Distribiotion patterns of methicillin resistance genes (mecA) in staphylococcus aureus isolated from clinical from specimens. Iran Biomed J 2004; 8(4): 173-8.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29. No 151. 3rd week. October 2011 Received: 15.6.2011 Accepted: 25.8.2011

Comparison of the Results of Polymerase Chain Reaction and Oxacillin Agar Dilution Methods in Determining Resistance to Methicillin in Isolated *Staphylococcus Aureus* at Alzahra Hospital, Isfahan, Iran

Sayed Asghar Havaei PhD[1], Mohsen Karbalaeizadeh babaki MSc[2], Ebtehaj Pishva PhD[1]

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* is an important infectious bacterium. The pathogenicity of this bacterium is critical in both society and hospital. It is a human normal flora that exists in the upper respiratory tract of 25% of healthy individuals. It causes a wide spectrum of diseases ranging from skin infections to severe infections including septicemia, endocarditis, pneumonia, and skin abscess. *S. aureus* is a considerable factor of severe infections in both society and hospital. Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains have high mortality rates. Therefore, the rate of MRSA must be quickly identified and controlled with treating measures.

Methods: A total number of 114 strains of *S. aureus* were obtained from the specimens at Alzahra Hospital, Isfahan, Iran. Minimum inhibitory concentration (MIC) of oxacillin for MRSA was performed with agar dilution method and eventually polymerase chain reaction (PCR) for mecA gene.

Findings: Out of 114 samples, 35 isolates had mecA gene that were assessed with agar dilution method. According to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), MIC of oxacillin in agar dilution method was 8 µg/ml and results was recorded. MecA gene PCR was conducted for all strains and the results were compared with agar dilution method. From resistant isolates, 4% of the strains had mecA gene but were susceptible to methicillin in phenotypic method.

Conclusion: Our study showed agar dilution method to be more sensitive and specific than disk diffusion method. PCR is the best method to indentify susceptible and resistant strains to methicillin. Some strains were susceptible to oxacillin in phenotypic method but their mecA gene was identified with PCR.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MecA gene, Methicillin resistant strains

---

* This paper was derived from an MSc thesis in Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

[1] Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] MSc Student, Student Research Committee, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohsen Karbalaeizadeh Babaki MSc, Email: mohsenkarbalaei@ymail.com