مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۳/هفته سوم دی ماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۴

شناسایی اختصاصی استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از تکنیک Multiplex PCR

مهدی حاصلی[۱]، دکتر علی رمضانی[۲]، علیرضا خالقی خرم[۳]، لاله مهرد[۴]

چکیده

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های خطرناکی است که عامل بسیاری از بیماری‌های عفونی می‌باشد. به همین دلیل تشخیص، کنترل، شناسایی دقیق و درمان این باکتری بسیار حایز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه، راه‌اندازی روشی سریع با تکنیک Multiplex PCR برای تشخیص به موقع جهت ارائه‌ی راهکار لازم برای مقابله با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود.

روش‌ها: در این مطالعه از ۲۲۵ نفر از کارکنان شاغل در بیمارستان‌های آموزشی و درمانی شهر زنجان به روش تصادفی نمونه‌گیری از قسمت قدامی بینی انجام شد. پس از انجام تست‌های شناسایی و تأیید باکتری مورد نظر، جهت انجام آنتی‌بیوگرام از محیط کشت مولر هینتون آگار به روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer استفاده شد. پس از استخراج DNA به روش جوشان و روش فنل کلروفورم، ژن‌های femA، mecA و Sa442 (قطعه‌ای از کروموزوم اختصاصی باکتری) به طور هم‌زمان با دستگاه ترموسایکلر تکثیر شد و پس از انجام ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با SyberGreen DNA باندها شناسایی شدند.

یافته‌ها: از ۲۲۵ نمونه، در ۲۰۸ نمونه رشد کلنی مشاهده شد. از ۲۰۸ کلنی، ۲۰۳ نمونه گرم مثبت، ۲۰۱ نمونه کاتالاز مثبت و ۷۱ نمونه کوآگولاز مثبت گزارش شد. نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین و پنی‌سیلین بیشترین مقاومت و به آمیکاسین و ونکومایسین بیشترین حساسیت را دارد. با بهینه‌سازی شرایط PCR (Polymerase chain reaction) ژن‌های femA، mecA و Sa442 در یک میکروتیوب به صورت Multiplex تکثیر شدند.

نتیجه‌گیری: روش Multiplex PCR به عنوان یک تست سریع و دقیق در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن می‌تواند در شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین کمک کننده باشد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، mecA، femA، MRSA، Multiplex PCR

مقدمه

استافیلوکوک‌ها یکی از جنس‌های مهم و بیماری‌زای خانواده‌ی میکروکوکاسه می‌باشند. این باکتری‌ها در سطح بدن انسان و حیوانات وجود دارند و در شرایط خاص می‌توانند بیماری‌زا شوند. با این حال، عفونت‌های استافیلوکوکی بسیار شایع هستند و بیشترین سویه‌های بیماری‌زا در این خانواده مربوط به گونه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد که بیماری‌هایی از قبیل فولیکولیت، زرد زخم، استئومیلیت، و سندرم شوک سمی را ایجاد می‌کند (۱).

مقاومت به تتراسایکلین در بین سویه‌های استافیلوکوک به طور وسیعی گسترش یافته است و به همراه مقاومت به بتالاکتام‌ها و ماکرولیدها یکی از فراوان‌ترین انواع مقاومت به داروهای ضد میکروبی است

[۱] دانشجوی دکترای داروسازی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
[۲] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
[۳] کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر علی رمضانی
Email: ramazania@zums.ac.ir

که در بین سویه‌های مختلف استافیلوکوک پیدا می‌شود. یکی از مشکلات بزرگ پزشکان از دهه‌ی ۱۹۸۰ به بعد، ظهور استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant staphylococcus aureus یا MRSA) می‌باشند. تعداد این سویه‌ها که از نمونه‌های بالینی در سراسر دنیا جدا می‌شوند رو به فزونی است. سویه‌های MRSA نسبت به داروهای ضد میکروبی زیادی مقاومت دارند. پیش از شیوع عفونت‌های حاصل از MRSA به مراکز درمانی خاصی محدود بود، ولی امروزه در همه‌ی بیمارستان‌های سراسر دنیا استقرار یافته‌اند. این باکتری‌ها می‌توانند از بیماران به یکدیگر یا از ناقلین شاغل در مراکز درمانی به بیماران منتقل شوند. سویه‌های MRSA در بیمارستان‌هایی که برای بیماران قلبی دریچه‌های مصنوعی قلب کار گذاشته می‌شود، مشکلات فراوانی را ایجاد می‌نمایند (۳-۲).

ونکومیسین داروی انتخابی برای اندوکاردیت حاصل از MRSA می‌باشد (۴). این داروی استراتژیک بهتر است فقط برای درمان بیماران مبتلا به عفونت سیستمیک مثل پنومونی و اندوکاردیت ناشی از این باکتری‌ها اختصاص داده شود. اگر ونکومیسین همراه با ریفامپین یا جنتامیسین مصرف شود، توانایی درمانی بیشتری روی MRSA خواهد داشت. برای پیشگیری و کنترل عفونت‌های بیمارستانی ناشی از MRSA و سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین، شستشوی مناسب دست‌ها بسیار مؤثر خواهد بود (۶-۵).

این سویه‌ها به علت دارا بودن ژن mecA نسبت به متی‌سیلین و طیف زیادی از داروهای ضد استافیلوکوکی مقاومت نشان می‌دهند. گاهی سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین در آزمایشگاه نسبت به دیگر داروهای بتالاکتام مثل سفالوسپورین‌ها حساسیت نشان می‌دهند، اما در کلینیک تأثیر مثبتی از آن‌ها دیده نشده است. بنابراین سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به اگزاسیلین را باید نسبت به تمام داروهای بتالاکتام، مقاوم در نظر گرفت. امروزه سویه‌های MRSA در بیمارستان‌های بیشتر کشورهای جهان یافت می‌شوند. این باکتری‌ها به چندین آنتی‌بیوتیک مقاومت دارند و در بیماری‌زایی متفاوت عمل می‌کنند. ایجاد عفونت توسط آن‌ها به حساسیت میزبان نیز بستگی دارد. به طور معمول سویه‌های MRSA در قسمت‌های مختلف آناتومیکی پرسنل شاغل در بیمارستان‌ها جایگزین می‌شوند و به وسیله‌ی دست‌ها و دیگر فعالیت‌ها از فردی به فرد دیگر یا به بیماران بستری منتقل می‌شوند و بدین ترتیب سبب ایجاد اپیدمی در بیمارستان‌ها می‌گردند و به مدت طولانی در بیمارستان‌ها پایدار می‌مانند (۷).

مقاومت استافیلوکوک‌ها به پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز به حضور پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین منحصر به فردی ارتباط دارد که در سطح سلول باکتری ظاهر می‌شوند و تمایل کمی در اتصال به این دسته از داروها دارند. این پروتئین‌ها به وسیله‌ی ژن mecA کد می‌شوند (۸). شناسایی مقاومت به اگزاسیلین (متی‌سیلین) در استافیلوکوک‌های حاوی ژن mecA با روش استاندارد و معمول آزمایشگاهی قابل انجام است (۱۰-۹).

تست‌های شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی مختلفی برای بررسی مقاومت به ژن mecA وجود دارد که عبارت از MIC (Minimum inhibitory concentration)، Disk Diffusion، غربالگری اگزاسیلین با آگار، روش آگلوتیناسیون لاتکس برای PBP2a، تکثیر ژن mecA

با PCR (Polymerase chain reaction) و یا با Real time PCR می‌باشند (۱۳-۱۱).

هدف از این مطالعه، راه‌اندازی تست تشخیص مولکولی جهت شناسایی سریع و آسان استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از تکنیک Multiplex PCR بود. در این تکنیک ژن مقاوم بودن به متی‌سیلین (mecA) به همراه ژن femA که آنزیم کوآگولاز را در استافیلوکوکوس اورئوس کد می‌کند و برای بیان ژن mecA ضروری است، تکثیر گردید.

از قطعه‌ای از کروموزوم اختصاصی باکتری به نام Sa442 (S. aureus-specific 442-bp genomic DNA) به عنوان شاهد داخلی در واکنش PCR استفاده شد (۱۴).

روش‌ها

تعداد ۲۲۵ نمونه از قسمت قدامی بینی پرسنل شاغل در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی- درمانی آیت‌اله موسوی و ولی‌عصر (عج) زنجان در طول یک سال به طور تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها جهت کشت در محیط مانیتول سالت آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از رشد کلنی تست‌های تکمیلی فنوتیپی شامل گرم، کاتالاز و کوآگولاز انجام گردید. استافیلوکوکوس اورئوس به علت داشتن آنزیم کاتالاز موجب شکسته شدن آب اکسیژنه می‌شود و تولید اکسیژن می‌کند. این فرایند سبب ایجاد حباب می‌شود. آزمایش کوآگولاز جهت تعیین افتراق بین استافیلوکوک‌های تولیدکننده‌ی کوآگولاز از سایر گونه‌های استافیلوکوک می‌باشد و به دو روش لوله‌ای و آزمایش روی لام قابل انجام است. در این مطالعه از روش روی لام استفاده شد. ذرات درشت و سفید رنگ، بعد از انجام تست نشانگر مثبت بودن تست کوآگولاز است.

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و بر اساس استانداردهای CLISI (Clinical and laboratory standards institute) ارزیابی شدند که در آن سوسپانسیون میکروبی معادل نیم McFarland تهیه شده روی محیط مولر هینتون آگار کشت گردید (۱۵).

دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل اگزاسیلین، پنی‌سیلین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، ونکومایسین، آمیکاسین، کلیندامایسین، سیپروفلوکساسین و تتراسایکلیین بودند که به فاصله‌ی ۲/۴ سانتی‌متر از یکدیگر (مرکز تا مرکز دیسک دیگر) روی محیط مورد نظر جاگذاری شدند و بعد از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید (۱۷-۱۶).

برای استخراج DNA و انجام آزمایش PCR از روش جوشان (Boiling) استفاده گردید (۱۸). بدین صورت که ابتدا چند کلنی تازه از محیط کشت حاوی MRSA خالص، در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه یا آب مقطر استریل به شکل سوسپانسیون در آمد و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد جوشانده شد. سپس با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی که حاوی DNA باکتری بود برای PCR استفاده و رسوب کنار گذاشته شد.

جهت تأیید درجه‌ی خلوص DNA در نمونه‌های استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر استفاده شد. میزان خلوص DNA با نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نشان داده می‌شود. پرایمرهای مورد نظر جهت تکثیر ژن‌های

femA و mecA با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner طراحی شدند. توالی پرایمرهای Sa442-F و Sa442-F از مقالات قبلی استخراج شد (۱۴).

توالی پرایمرها و اندازه‌ی قطعات حاصل از تکثیر ژن‌های Sa442، femA و mecA در جدول ۱ نشان داده شده است.

بعد از چندین بار آزمایش در نهایت شرایط بهینه برای انجام آزمایش Multiplex PCR به دست آمد. واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ میلی‌مولار KCl، ۱۰ میلی‌مولار Tris HCl با pH = ۸/۳، ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۴۰۰ میکرومولار dNTPs، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ و غلظت هر کدام از پرایمرهای مستقیم (F) و معکوس (R) برای هر سه ژن ۵ پیکومولار انجام شد (جدول ۲).

پروتکل دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر هم‌زمان ژن‌های Sa442، mecA و femA در جدول ۳ نشان داده شده است. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و باندها پس از رنگ‌آمیزی با SyberGreen زیر تابش اشعه‌ی ماورای بنفش ظاهر شدند (۲۰-۱۹). جهت تأیید توالی ژن‌های مورد نظر، محصولات PCR توسط شرکت Bioneer کره تعیین توالی شدند و توالی ژن‌ها بعد از اصلاح با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی در بانک ژنی ثبت شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرها و اندازه‌ی قطعات حاصل از تکثیر ژن‌های Sa442، femA و mecA

نام پرایمر	توالی ('5 to 3')	اندازه‌ی باند (جفت باز)
Sa442-F	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	۱۰۸
Sa442-R	CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA	
FemA-R	TTATCTCGCTTGTTATGTG	۶۸۶
FemA-F	TTACTGCTGTACCTGTTATG	
MecA-R	ATGGCTATCGTGTCACAATC	۳۱۰
MecA-F	CTGGAACTTGTTGAGCAGAG	

جدول ۲. مواد لازم جهت PCR (Polymerase chain reaction) برای تکثیر همزمان ژن‌های Sa442، mecA و femA استافیلوکوکوس اورئوس در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

مواد	مقدار
dNTPs	۴۰۰ میکرومولار
پرایمرهای مستقیم و معکوس برای هر سه ژن Sa442، mecA و femA	۵ پیکومولار
منیزیم کلراید	۳ میلی مولار
پتاسیم کلراید	۵۰ میلی‌مولار
Tris HCl	۱۰ میلی‌مولار
پلیمراز Taq DNA آنزیم	۲ واحد

www.mui.ac.ir

جدول ۳. پروتوکول دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر هم‌زمان ژن‌های Sa442، mecA و femA

مرحله	زمان	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	چرخه
واسرشت اولیه	۵ دقیقه	۹۴	۱ مرحله
واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴	۱۰ مرحله
اتصال	۱/۵ دقیقه	۶۰	۱۰ مرحله
تکثیر	۱/۵ دقیقه	۷۲	۱۰ مرحله
واسرشت نهایی	۴۵ ثانیه	۹۴	۲۵ مرحله
اتصال نهایی	۴۵ ثانیه	۵۵	۲۵ مرحله
تکثیر نهایی	۱/۵ دقیقه	۷۲	۲۵ مرحله

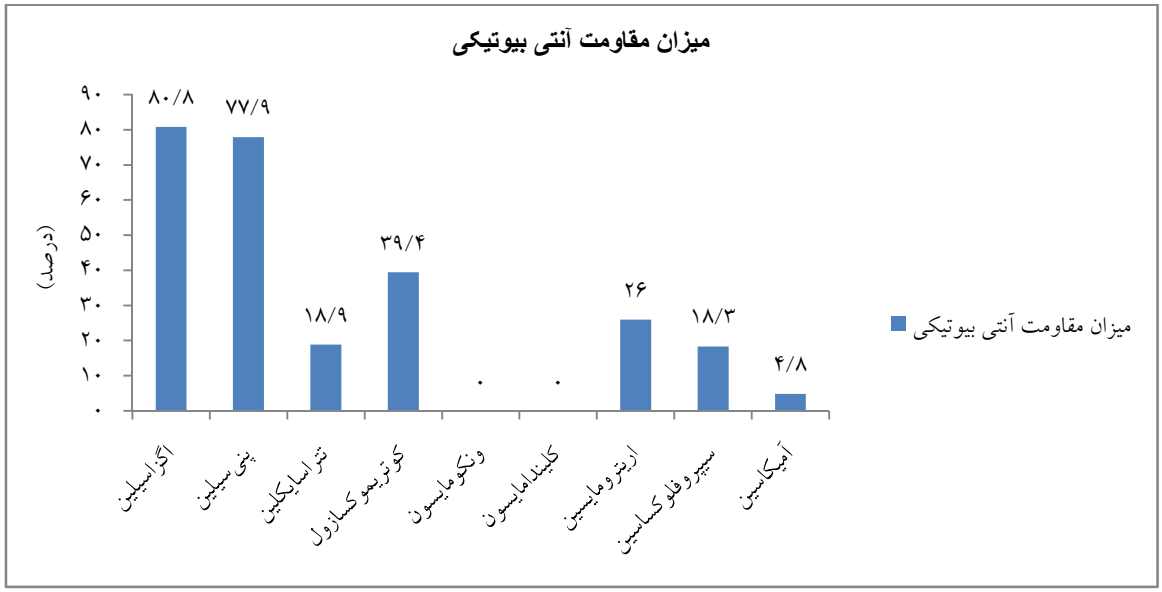
یافته‌ها

۲۲۵ فرد در این آزمایش مورد مطالعه قرار گرفتند که از بیمارستان‌های آموزشی- درمانی ولی‌عصر (عج) و آیت‌اله موسوی شهر زنجان به طور تصادفی انتخاب شده بودند. ۵۳/۸ درصد از افراد مورد مطالعه زن و ۴۶/۲ درصد مرد بودند.

بعد از نمونه‌گیری از قسمت قدامی بینی پرسنل بیمارستان به وسیله‌ی سواپ استریل، نمونه‌های اولیه در محیط کشت مانیتول سالت آگار کشت داده شدند. ۲۰۸ مورد، رشد کلنی باکتری مشهود بود که برای تشخیص نوع باکتری، آزمایشات تشخیصی روی آن‌ها انجام گرفت. از ۲۰۸ نمونه، ۲۰۱ نمونه کاتالاز مثبت و ۷۱ مورد کواگولاز مثبت بودند.

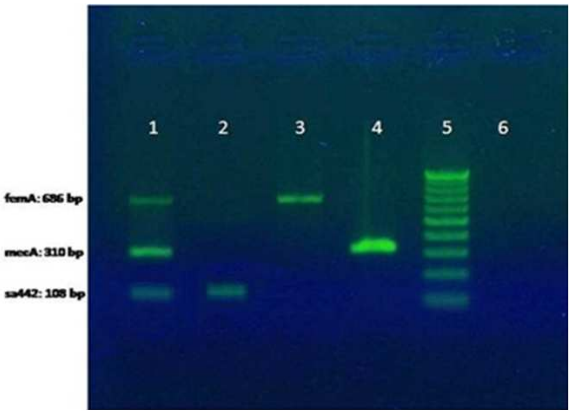
تست آنتی‌بیوگرام به وسیله‌ی ۹ دیسک آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین مقاومت به پنی‌سیلین و اگزاسیلین و بیشترین حساسیت به ونکومایسین گزارش شد (شکل ۱).

Multiplex PCR بر روی تمام ۲۰۸ کلنی انجام گرفت که از این تعداد ۲۰۴ نمونه حاوی کروموزوم اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس (Sa442) بودند که در الکتروفورز باند ۱۰۸ جفت بازی ظاهر شد. از ۲۰۴ نمونه‌ی تأیید شده با PCR ۱۷۲ نمونه (۸۴/۳



شکل ۱. درصد حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از پرسنل شاغل در بیمارستان‌ها

درصد) حاوی ژن mecA بودند که در الکتروفورز باند ۳۱۰ جفت بازی را نشان داد. ۷۵ ایزوله (۳۶/۸ درصد) حاوی ژن femA با اندازه‌ی باند ۶۸۶ جفت باز بودند. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. نتایج الکتروفورز هر سه ژن SA442، femA و mecA به روی آکارز ۱/۵ درصد. ۱: بیان هر سه ژن femA،SA442 و mecA، ۲: بیان ژن SA442، ۳: بیان ژن femA، ۴: بیان ژن mecA، ۵: 100bp DNA ladder و ۶: شاهد منفی

توالی ژن‌های femA و mecA بعد از تعیین توالی توسط شرکت Bioneer کره با نرم‌افزار Chromas LITE نسخه‌ی ۲/۰۱ اصلاح گردید و نتایج تعیین توالی در بانک ژنی با شماره‌های دسترسی JX426257، JX426258 و JX426259 ثبت شد.

بحث

اولین بار شیوع عفونت‌های ناشی از MRSA در سال ۱۹۶۰ در اروپا گزارش شد. شیوع این عفونت‌ها از سال ۱۹۸۰ به بعد نیز در سرتاسر جهان گزارش شده است، به طوری که امروزه ۲۵ درصد عفونت‌های بیمارستانی که توسط استافیلوکوکوس اورئوس در آمریکا ایجاد می‌شود، مربوط به MRSA است (۲۱). با توجه به اهمیت موضوع روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مختلفی جهت شناسایی MRSA در مناطق مختلف دنیا صورت گرفته است و در حال انجام است.

نتایج مطالعه‌ی Vannuffel و همکاران، بر روی نمونه‌های جدا شده از ونتیلاتورهای متصل به تراشه‌ی بیماران بستری در بیمارستان‌های بلژیک، حاکی از این بود که با روش Multiplex PCR می‌توان به طور سریع و دقیق به شناسایی MRSA پرداخت. در این مطالعه از ۶۰ نمونه‌ی جداشده‌ی استافیلوکوکوس اورئوس، ۵۷ مورد MRSA با روش Multiplex PCR شناسایی شدند که دارای ژن mecA و femA بودند (۲۲).

نتایج تحقیقی دیگر، که توسط Choi و همکاران در کشور کره با استفاده از روش Multiplex PCR، بر روی ۹۲ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده انجام شد، نشان داد که ۶۱ نمونه MRSA بودند. در PCR نیز ۵۴ نمونه (۵۸/۶ درصد) mecA مثبت گزارش شدند، که در مقایسه با نتایج کار ما ژن mecA فراوانی کمتری در بین سویه‌های مورد مطالعه داشت (۲۳).

در مطالعه‌ی Kearns و همکاران از دو ژن mecA و coaA (کدکننده‌ی کوآگولاز) به صورت Multiplex جهت شناسایی ایزوله‌های تازه استفاده شد (۲۴)؛ اما در مطالعه‌ی حاضر قطعه‌ای از کروموزوم اختصاصی باکتری یعنی Sa442 هم به دو ژن قبلی اضافه شد تا به عنوان شاهد داخلی استفاده شود.

در مطالعه‌ی حاضر از سه ژن mecA، femA و SA442 به صورت هم‌زمان استفاده شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به بروز مقاومت به استافیلوکوکوس اورئوس و افزایش آن و اهمیت درمان بیماران و مدیریت

صحیح درمانی در مراکز درمانی و بهداشتی روش Multiplex PCR می‌تواند یک روش سریع، دقیق و مؤثر در تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین باشد.

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در مقایسه با مطالعات قبلی (۲۷-۲۵، ۲۲)، تکنیک Multiplex PCR روش مناسبی برای شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن mecA و femA محسوب می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاون محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان به جهت حمایت مالی این طرح سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Abdel-moein KA, El-Hariri M, Samir A. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging pathogen of pets in Egypt with a public health burden. Transbound Emerg Dis 2012; 59(4): 331-5.
2. Agerso Y, Hasman H, Cavaco LM, Pedersen K, Aarestrup FM. Study of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. Vet Microbiol 2012; 157(1-2): 246-50.
3. Annear DI. The effect of temperature on resistance of Staphylococcus aureus to methicillin and some other antibioics. Med J Aust 1968; 1(11): 444-6.
4. Taguchi H, Matsumoto T, Ishikawa H, Ohta S, Yukioka T. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus based on culture and PCR in inpatients at a tertiary care center in Tokyo, Japan. J Infect Chemother 2012; 18(5): 630-6.
5. Chen HY, Chen CC, Fang CS, Hsieh YT, Lin MH, Shu JC. Vancomycin activates sigma(B) in vancomycin-resistant Staphylococcus aureus resulting in the enhancement of cytotoxicity. PLoS One 2011; 6(9): e24472.
6. Dickson EM, Davidson MM, Hay AJ, Ho-Yen DO. A cost-effective protocol for screening patients for methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Br J Biomed Sci 2011; 68(3): 126-30.
7. Guler I, Kilic H, Atalay MA, Percin D, Ercal BD. Genotyping of nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens by rep-PCR. Mikrobiyol Bul 2011; 45(4): 581-91.
8. Bode LG, van Wunnik P, Vaessen N, Savelkoul PH, Smeets LC. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in screening samples by relative quantification between the mecA gene and the SA442 gene. J Microbiol Methods 2012; 89(2): 129-32.
9. Basset P, Senn L, Prod'hom G, Bille J, Francioli P, Zanetti G, et al. Usefulness of double locus sequence typing (DLST) for regional and international epidemiological surveillance of methicilin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 2010; 16(8): 1289-96.
10. Becker AP, Santos O, Castrucci FM, Dias C, D'Azevedo PA. First report of methicillin-resistant Staphylococcus aureus Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil. Epidemiol Infect 2012; 140(8): 1372-5.
11. Allaouchiche B, Jaumain H, Zambardi G, Chassard D, Freney J. Clinical impact of rapid oxacillin susceptibility testing using a PCR assay in Staphylococcus aureus bactaeremia. J Infect 1999; 39(3): 198-204.
12. Ben SN, Ben AH, Hannachi N, Boukadida J. Multiclonality of methicilin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital. Med Mal Infect 2005; 35(6): 363-6.
13. Soderquist B, Neander M, Dienus O, Zimmermann J, Berglund C, Matussek A, et al. Real-time multiplex PCR for direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in clinical samples enriched by broth culture. APMIS 2012; 120(5): 427-32.
14. 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.
15. Tenover FC, Moellering RC, Jr. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis 2007; 44(9): 1208-15.
16. Lee J, Sung JY, Kim YM, Oh CE, Kim HB, Choi EH, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus obtained from the anterior nares of healthy Korean children attending daycare centers. Int J Infect Dis 2011; 15(8): e558-e563.
17. Leonhardt KK, Yakusheva O, Phelan D, Reeths A, Hosterman T, Bonin D, et al. Clinical

effectiveness and cost benefit of universal versus targeted methicillin-resistant Staphylococcus aureus screening upon admission in hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 2011; 32(8): 797-803.

18. Afghani B, Stutman HR. Polymerase chain reaction for diagnosis of M. tuberculosis: comparison of simple boiling and a conventional method for DNA extraction. Biochem Mol Med 1996; 57(1): 14-8.

19. Fosheim GE, Nicholson AC, Albrecht VS, Limbago BM. Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and associated toxin genes. J Clin Microbiol 2011; 49(8): 3071-3.

20. Hirvonen JJ, Nevalainen M, Tissari P, Salmenlinna S, Rantakokko-Jalava K, Kaukoranta SS. Rapid confirmation of suspected methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonies on chromogenic agars by a new commercial PCR assay, the GenomEra MRSA/SA Diagnose. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(8): 1961-8.

21. Farley JE, Ross T, Stamper P, Baucom S, Larson E, Carroll KC. Prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among newly arrested men in Baltimore, Maryland. Am J Infect Control 2008; 36(9): 644-50.

22. 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.

23. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, et al. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. J Korean Med Sci 2003; 18(5): 631-6.

24. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. J Hosp Infect 1999; 43(1): 33-7.

25. Martineau F, Picard FJ, Grenier L, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. J Antimicrob Chemother 2000; 46(4): 527-34.

26. Zmantar T, Chaieb K, Ben AF, Ben Kahla-Nakbi A, Ben HA, Mahdouani K, et al. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus strains isolated from auricular infections. Folia Microbiol (Praha) 2008; 53(4): 357-62.

27. Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Mendez-Alvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of Staphylococcus aureus and detection of methicillin and mupirocin resistance. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 4037-41.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 213, 3rd week, January 2013 Received: 28.9.2012 Accepted: 24.11.2012

Specific Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by Multiplex Polymerase Chain Reaction

Mehdi Haseli[1], Ali Ramazani PhD[2], Alireza Khaleghi Khorram MSc[3], Laleh Mehrad[4]

Abstract

Background: As *Staphylococcus aureus* cause various infectious diseases, detection, control and treatment of this pathogen is very important. The objective of this study was to find a fast method to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* for better management of diseases related to this pathogen.

Methods: We collected 225 samples from the staff of university hospitals in Zanjan Province (Iran). After detection and confirmation of bacteria by conventional and biochemical methods, antimicrobial susceptibility was tested by disk diffusion (Kirby-Bauer) antibiotic sensitivity testing. After extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) by boiling method, *Staphylococcus aureus* genes (SA442, mecA and femA) were detected by multiplex polymerase chain reaction (PCR). PCR products were then analyzed by agarose gel electrophoresis (70 V, 30 minutes, 1.5% weight/volume) and SYBR Green staining.

Findings: From 225 samples, 208 samples made colony in bacterial culture medium. Of these, 203, 201, and 71 isolates were Gram positive, catalase positive, and coagulase positive, respectively. Most of the isolates were resistant to oxacillin and penicillin. By optimization of PCR conditions, SA442, mecA and femA genes were simultaneously amplified in a single reaction tube.

Conclusion: Compared to disk diffusion antibiotic sensitivity testing, multiplex PCR can rapidly and selectively detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.*

Keywords: Staphylococcus aureus, MecA, FemA, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Multiplex polymerase chain reaction

[1] PharmD Student, Department of Biotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[3] Department of Microbiology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[4] MSc Student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Arak, Iran
Corresponding Author: Ali Ramazani PhD, Email: ramazania@zums.ac.ir