

بررسی مولکولی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ایزوله شده از بیمارستان های آموزشی شهرکرد

علیرضا دهقان^۱، ابوالفضل قلی پور^{۲*}، راضیه نظری^۱، فاطمه هیبتی^۲

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛ ^۲ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۷

چکیده:

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی یکی از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی هستند. مقاومت به متی-سیلین در این گروه از باکتری ها مشاهده شده است. این مطالعه با هدف بررسی و مقایسه مقاومت به متی سیلین به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی در باکتری های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس جدا شده از نمونه های بیمارستان های آموزشی شهرکرد طراحی و اجرا گردید.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی تعداد ۲۹۰۰ نمونه مختلف شامل خون، ادرار و غیره از بیماران بستری در بیمارستان های هاجر (س) و آیت الله کاشانی شهرکرد از آذر ماه سال ۱۳۹۱ تا مهر ماه سال ۱۳۹۲ جمع آوری شد؛ سپس با انجام آزمایشات میکروبیولوژی، تعداد ۱۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی انتخاب شد. در مرحله بعد به طور همزمان مقاومت فنوتیپی به روش انتشار از دیسک (Disk diffusion) و مقاومت ژنوتیپی (ژن مقاومت به متی سیلین) با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز بررسی گردید.

یافته ها: از بین ۱۵۰ ایزوله مورد بررسی، در بررسی فنوتیپی ۷۰ ایزوله (۴۶/۶۶ درصد) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۳۸/۴۹-۵۴/۹۸ درصد) و در بررسی ژنوتیپی ۶۴ ایزوله (۴۲/۶۶ درصد) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۳۴/۶۳-۵۱ درصد) به متی سیلین مقاوم بودند. توزیع مقاومت فنوتیپی و مقاومت ژنوتیپی در دو بیمارستان مورد مطالعه برابر بود ($P > 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج ژنوتیپی نشانگر حضور ژن مقاومت به متی سیلین می باشد. بررسی ژنوتیپی به کمک واکنش زنجیره پلیمرز مرکب، ابزاری مطمئن برای نشان دادن میزان مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس های اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس می باشد.

واژه های کلیدی: بیمارستان های آموزشی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، مقاومت ژنوتیپی.

مقدمه:

همچنین در سال های اخیر بروز اپیدمی استافیلوکوکوسی از چندین بیمارستان در دنیا گزارش شده است. در بسیاری اوقات این باکتری ها به عنوان سومین عامل عفونت بیمارستانی مطرح شده اند (۲،۱). استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی به طور

در طی دهه گذشته استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی (Coagulase Negative Staphylococci=CNS یا CoNS) یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی، باکتری، اندوکاردیت، عفونت زخم، عفونت ادراری، پنومونی، عفونت پوست و بافت نرم بوده اند؛

*نویسنده مسئول: شهرکرد- رحمتیه- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی- تلفن: ۰۹۱۳۷۰۴۶۶۵۶،

E-mail: gholipour_abolfazl@yahoo.com

نیز عفونت ایجاد می‌کند (۷). پنی سیلین‌های نیمه سنتتیک مقاوم به بتالاکتاماز (مانند متی سیلین، نفسیلین، آگراسیلین و دی کلوگراسیلین) برای مقابله با باکتری‌های مقاوم به پنی سیلین ساخته شدند. متی سیلین اولین دارو از این دسته است که در سال ۱۹۶۰ جهت رفع سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی سیلین معرفی شد. پس از معرفی متی سیلین به سرعت گزارشات مبنی بر ایجاد مقاومت اعلام شد. اولین بار وجود سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*= MRSA) در انگلستان گزارش شد و سویه‌های مذکور به سرعت در سراسر دنیا گسترش یافتند (۸). در طی دهه ی ۱۹۷۰ پنداشته می شد که مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی مقاوم به متی سیلین (Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci=MRCNS) در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA)، شیوع بیشتری دارد. این تفکر تا به امروز نیز به قوت خود باقی مانده است (۳).

مقاومت به متی سیلین در CoNS شایع است، این مقاومت اساساً مربوط به بیان ژن *mecA* می باشد که یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (Penicillin Binding Protein 2a=PBP2a) را کد می‌کند که یک ترانس پیپتیداز با میل ترکیبی پایین برای بتالاکتام ها است. ژن *mecA* بر روی کاست کروموزومی استافیلوکوکوسی (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*=SCCmec) قرار دارد که این کاست جزو عناصر ژنتیکی متحرک (Mobile Genetic Elements=MGE) بوده و بررسی خصوصیت این اجزاء ژنتیکی می تواند از نظر اپیدمیولوژیکی مفید باشد (۹،۱۰).

طبق آمار سیستم ملی نظارت بر عفونت‌های بیمارستانی ایالات متحده، میزان MRSA از سال ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۱، ۱۳٪ افزایش یافته است. در کشورهای اروپایی، این میزان بسیار متغیر و از کمتر از یک درصد در کشورهای شمال اروپا (از قبیل دانمارک و هلند) تا بیش از ۴۰٪ در کشورهایی نظیر انگلستان و یونان و ایتالیا گزارش شده است. از بین

برجسته ای در طی دهه‌های گذشته بیماریزا شده اند و دلیل آن استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها برای درمان یا پیشگیری بوده است؛ از طرفی، آن دسته از سویه‌های CoNS که از بیمارستان ها کسب شده اند، به عوامل ضد میکروبی مختلف، مقاوم بوده اند (۳). CNS ها جزو فلور طبیعی پوست هستند که می‌توانند در مخاط بینی و مجاری تنفسی و همچنین در تجهیزات پزشکی مستقر شوند. چسبیدن این باکتری ها به سطح کاتترها و سایر تجهیزات مثل دریچه های مصنوعی قلب و ایمپلنت های ارتوپدیک و توانایی بقای آن ها بر روی مواد بیولوژیک، به عنوان اولین مرحله در عفونت های خون ناشی از کاتترها مطرح می شود (۲).

استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی به خصوص استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس می‌توانند عامل عفونت مفاصل مصنوعی (خصوصاً مفصل ران) باشند. در طی این عفونت علائم سیستمیک مانند تب و لکوسیتوز مشاهده نمی شود؛ علاوه بر این، نتیجه کشت خون بیمار، معمولاً منفی است و فرد مبتلا، به طور معمول فقط درد موضعی و نارسایی مکانیکی مفصل را تجربه می‌کند. درمان در چنین مواردی، مشتمل بر تعویض مفصل و درمان آنتی بیوتیکی است (۴،۵). تقریباً ۷۵ درصد از این عفونت ها توسط استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ایجاد می‌شوند که اغلب عامل عفونت های بیمارستانی و مخصوصاً عفونت وسایل درمانی و پزشکی بکار رفته در بدن است (۴،۶). استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس نیز یکی دیگر از گونه‌های شایع CoNS است. بر خلاف سایر CoNS، مقاومت به آنتی بیوتیک های مؤثر بر کوکسی‌های گرم مثبت از جمله متی سیلین در این باکتری کمتر دیده شده است. این باکتری یکی از عوامل نسبتاً رایج عفونت دستگاه ادراری در زنان جوان می‌باشد. احساس درد هنگام دفع ادرار، وجود چرک و تعداد زیادی ارگانیزم در ادرار خانم‌های مبتلا از نشانه های عفونت دستگاه ادراری می باشد. بعلاوه این گونه در بیماران بستری در بیمارستان

کاشانی شهرکرد با رعایت اصول نمونه گیری استریل، وارد مطالعه شدند.

با فرض این که شیوع استافیلوکوکوس های اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس در جامعه برابر با ۵ درصد باشد و با در نظر گرفتن اطمینان حداقل ۹۸ درصد و دقت یک درصد، حجم نمونه تعیین شد. نمونه ها شامل نمونه خون، ادرار، مایعات و ترشحات بدن (مایع مغزی نخاعی، مایع سینوویال، مایع پلور، مایع دیالیز صفاقی و ترشحات زخم) بودند. کشت ترشحات و مایعات بدن در محیط (Trypticase Soy Broth= TSB) و بلاد آگار، کشت خون در محیط دو فازی و بلاد آگار و کشت ادرار مستقیماً در محیط بلاد آگار انجام گرفت (۱۶،۳).

از کلنی های صاف و گرد با رنگ سفید یا کرمی گسترش تهیه شد و رنگ آمیزی گرم صورت گرفت. در همه نمونه ها کوکسی های گرم مثبت تک، دوتایی و خوشه ای مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا تست کاتالاز انجام شد که نتیجه مثبت نشانه استافیلوکوکوس بودن میکروارگانسیم بود؛ سپس تست کوآگولاز به دو روش اسلایدی و لوله ای انجام گرفت و برای کلنی های کوآگولاز منفی، تست های اکسیداز و بررسی حساسیت به باسیتراسین انجام شد. کلنی های اکسیداز منفی و مقاوم به باسیتراسین از میکروکوک ها تفکیک و به عنوان استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی در نظر گرفته شدند؛ پس از آن، تست حساسیت به نوویوسین انجام گرفت. لازم به ذکر است که استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به نوویوسین حساس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس مقاوم است (۱۶،۱۷). به این ترتیب تعداد ۱۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی به دست آمد. نمونه های حاوی باکتری های غیر از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس از مطالعه خارج شدند.

از هر یک از ۱۵۰ ایزوله به دست آمده یک کلنی تک برداشته و در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۰/۷ سی سی محیط TSB وارد و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد شیکر دار قرار داده

کشورهای آسیایی، بالاترین شیوع MRSA را کشور ژاپن (۷۱/۶٪) به خود اختصاص داده است (۱۱).

متغیر بودن شیوع MRSA در کشورهای مختلف، می تواند ناشی از مشکل عدم تشخیص صحیح مقاومت به متی سیلین در باکتری های مذکور باشد. روش های شناسایی مقاومت به متی سیلین شامل روش های فنوتیپی و ژنوتیپی می باشند؛ ولی روش های فنوتیپی مرسوم دارای مشکلاتی می باشند که قادر به تشخیص صحیح این مقاومت نمی باشند. از آنجایی که عدم شناسایی بموقع استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین می تواند از نظر بالینی مشکلاتی را ایجاد نماید؛ لذا بکارگیری روش های سریع، دقیق و حساس ژنوتیپی می تواند بسیار کمک کننده باشد (۱۲،۱۳)؛ بنابراین تشخیص صحیح و سریع ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در درمان عفونت های استافیلوکوکوسی و همچنین در جلوگیری از گسترش عفونت ها بسیار مهم است. در این میان روش های مولکولی مبتنی بر PCR برای مشخص کردن ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی ارجح تر هستند (۱۴).

استافیلوکوکوس اورئوس مهمترین عامل بیماریزای این گروه است و اهمیت بالینی بالایی دارد. به دلیل توجه بیشتر به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، انواع کوآگولاز منفی کمتر مورد توجه قرار گرفته اند (۱۵). بدین منظور این مطالعه برای اولین بار در شهرستان شهرکرد و با هدف تعیین مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی، طراحی و اجرا گردید تا با آگاهی یافتن از الگوی مقاومت در این منطقه، جهت درمان عفونت های متعاقب ناشی از این میکروارگانسیم ها، تصمیم گیری های بهتری اتخاذ شود.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، از آذر ماه سال ۱۳۹۱ تا مهر ماه سال ۱۳۹۲ تعداد ۲۹۰۰ نمونه مختلف از بیماران بستری در بیمارستان های هاجر (س) و آیت الله

۰/۴ واحدی باستیراسین) (های مدیا، هندوستان)، در سطح محیط کشت قرار داده شد. سپس محیط کشت مزبور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. نتایج طبق راهنمای CLSI مورد بررسی قرار گرفت و در صورتی که قطر هاله مورد نظر در اطراف دیسک اگراسیلین از ۱۰ میلی متر کمتر بود، به عنوان سویه مقاوم به متی سیلین در نظر گرفته می‌شد (۱۹).

مقاومت ژنوتیپی به روش Multiplex PCR [ژن مقاومت به متی سیلین (mecA) به همراه ژن 16SrDNA] بررسی شد. بدین منظور، ابتدا DNA باکتریایی به روش جوشاندن (Boiling) استخراج شد (۲۱،۲۰). بررسی غلظت خلوص و کیفیت رشته‌های DNA استخراج شده با روش نورسنجی انجام شد. در این تحقیق از دو جفت پرایمر شامل: mecA جهت ردیابی ژن مقاومت به متی سیلین و 16SrDNA جهت ردیابی ژن 16SrDNA در سویه‌های استافیلوکوکوس استفاده شد (جدول شماره ۱) (۱۴).

شدند. سپس ۰/۳ میلی لیتر گلیسرول استریل افزوده و به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند (۱۸،۶).

ابتدا مقاومت فنوتیپی به روش انتشار از دیسک (Disk diffusion) بررسی شد. روش انتشار از دیسک که به روش کربی بایر (Kirby-Bauer) نیز شناخته می‌شود، یک روش در دسترس، نسبتاً ارزان و رایج در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی است که جهت انجام آنتی بیوگرام و همچنین بررسی مقاومت به متی سیلین مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج حاصله در تصمیم‌گیری پزشکان برای انتخاب صحیح دارو در روند درمان به طور روزمره استفاده می‌شود (۱۹،۱۸).

جهت تلقیح باکتری‌ها به محیط کشت، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت استاندارد (کدورت ۰/۵ مک فارلند) آماده شد و به طریق استریک بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. در ادامه دیسک ۱ میکرو گرمی اگراسیلین (همراه با دیسک ۲۰ میکرو گرمی ونکوماسین، دیسک ۳۰ میکرو گرمی نوویوسین و دیسک

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Multiplex PCR

اندازه	درصد GC	توالی	پرایمرها
۲۰ جفت باز	۵۵	۳-CAGCTCGTGTCTGAGATGT-۵	F 16SrDNA
	۴۵	۳-AATCATTGTCCCACCTTCG-۵	R 16SrDNA
۳۱۴ جفت باز	۵۰	۳-CCTAGTAAAGCTCCGGAA-۵	F mec A
	۵۲/۹	۳-CTAGTCCATTCGGTCCA-۵	R mec A

۵۰ میلی مول) ۲μl، آنزیم DNA Taq polymerase (۱/۵ واحد) ۰/۳μl و ۳μl DNA که با ddH₂O به حجم ۲۵μl رسانده شد.

شرایط تکثیر شامل: واسرشت اولیه (Pre denaturation) در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل، واسرشت شدن (Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال (Annealing) در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن

پرایمرها به صورت پودر لیوفیلیزه از شرکت ژن فن آوران خریداری و طبق دستورالعمل، غلظت ۱۰۰ میکرومولار تهیه شد. جهت جلوگیری از آلودگی تا زمان استفاده، به صورت جداگانه در میکروتیوب‌های استریل تقسیم و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تکثیر DNA به روش Multiplex PCR با رعایت نکات استاندارد انجام شد.

هر نمونه واکنش PCR شامل: بافر PCR ۱۰X (۱ میلی مول) ۲/۵μl، ۰/۳μl (۲۰ پیکومول) از هر ۴ پرایمر، Mixed dNTP (۱۰ میلی مول) ۰/۵μl، MgCl₂

و ۱۰۰ نفر زن بودند. سن آن‌ها در دامنه ۱ تا ۸۸ سال با میانگین ۳۶/۱۵±۲۴/۸۷ سال بود. از ۸۷ ایزوله به دست آمده از بیمارستان هاجر(س) ۵۰ نفر زن و ۳۷ نفر مرد و از مجموع ۶۳ ایزوله به دست آمده از بیمارستان آیت الله کاشانی ۵۰ نفر زن و ۱۳ نفر مرد بودند. یافته‌ها نشان می‌دهد که از بین ۱۵۰ ایزوله مورد بررسی، ۱۲۴ ایزوله (۸۲/۶ درصد) استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ۲۶ ایزوله (۱۷/۴ درصد) استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس بودند. آزمون کای اسکور نشان داد توزیع استافیلوکوکوس‌های اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس در بیمارستان هاجر(س) و آیت الله کاشانی شهرکرد برابر می‌باشد ($P>0/05$ ، جدول شماره ۲).

نهایی (Terminal extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. سپس میکروتیوب‌ها برای انجام الکتروفورز و قرائت نتایج از دستگاه خارج شدند. جهت انجام الکتروفورز محصولات PCR نیز از ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده شد. نتایج به کمک نرم افزار SPSS و آزمون آماري کای اسکور تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها:

از ۲۹۰۰ نمونه مورد بررسی ۱۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس به دست آمد که از این تعداد ۵۰ نفر مرد

جدول شماره ۲: فراوانی استافیلوکوکوس‌های اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس در بیمارستان هاجر(س) و آیت الله کاشانی شهرکرد

بیمارستان های آموزشی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس		استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس		جمع کل
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
بیمارستان هاجر (س)	۷۳	۸۳/۹	۱۴	۱۶/۱	۸۷
بیمارستان آیت الله کاشانی	۵۱	۸۰/۱	۱۲	۱۹/۹	۶۳
جمع کل	۱۲۴	۸۲/۶	۲۶	۱۷/۴	۱۵۰

درصد برابر با ۵۱-۳۴/۶۳ درصد) مقاومت ژنوتیپی داشتند یعنی دارای ژن *mecA* بودند که ۴۴ ایزوله مربوط به بیمارستان هاجر(س) و ۲۰ ایزوله مربوط به بیمارستان آیت الله کاشانی بود ($P>0/05$). بر اساس آزمون آماری کای اسکور توزیع مقاومت فنوتیپی و مقاومت ژنوتیپی (*mecA*) در دو بیمارستان مورد مطالعه برابر بود ($P>0/05$).

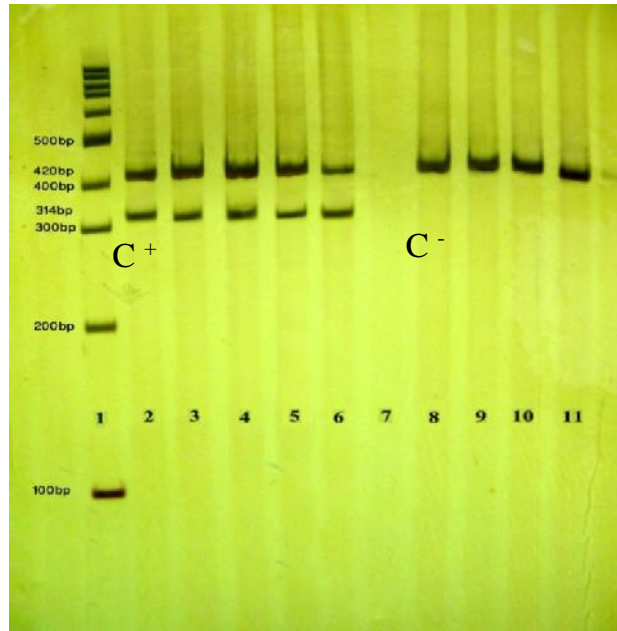
علاوه بر ردیابی ژن *mecA* همزمان ژن *16SrDNA* ردیابی شد و از سوش استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (تصویر شماره ۱)؛ همچنین نتایج آنتی بیوگرام نشان داد از بین ۱۵۰ ایزوله، مقاومت به ونکومايسين تنها در دو مورد (۱/۳٪) مشاهده شد؛ در حالی که در ۷۰ ایزوله (۴۶/۶۶٪)، مقاومت به آگراسیلین

بیشترین تعداد ایزوله‌های به دست آمده مربوط به نمونه‌های ادرار به میزان ۷۵ (۵۰٪) و کمترین تعداد مربوط به نمونه‌های گوش و ریه، هرکدام ۱ مورد (۰/۶۶٪) بوده است. سایر نمونه‌ها شامل ۳۱ نمونه خون، ۲۰ نمونه کاتتر، ۱۱ نمونه ترشحات زخم، ۴ نمونه ترشحات چشم، ۳ نمونه ترشحات بینی، ۲ نمونه مایع دیالیز و ۲ نمونه تراشه بود.

از بین ۱۵۰ ایزوله مورد بررسی، ۷۰ ایزوله (۴۶/۶۶ درصد) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۳۸/۴۹-۵۴/۹۸ درصد) در بررسی فنوتیپی به متی‌سیلین مقاوم بودند که از این تعداد ۴۸ ایزوله مربوط به بیمارستان هاجر(س) و ۲۲ ایزوله مربوط به بیمارستان آیت الله کاشانی بود ($P>0/05$). همچنین در بررسی ژنوتیپی ۶۴ ایزوله (۴۲/۶۶ درصد) با فاصله اطمینان ۹۵

دیده شد. پس از انجام تعیین توالی محصول PCR خالص شده، مقایسه توالی بدست آمده در نمونه تعیین توالی شده با توالی های موجود در پایگاه اطلاعاتی موجود در Gene Bank به کمک نرم افزار Blast انجام

شد. این مقایسه نشان داد که میزان تطبیق بین توالی ۱۶SrDNA مربوط و باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۱۰۰٪ می باشد و همچنین سویه مورد بررسی متعلق به سویه های استافیلوکوکوس می باشد.



تصویر شماره ۱: ژل رنگ آمیزی شده پلی اکریل آمید حاوی ژن های *mecA* و *16SrDNA*

به ترتیب از چپ به راست: ستون ۱ مارکر وزنی (100bp)، ستون ۲ کنترل مثبت (*Staphylococcus aureus ATCC 33591*)، ستون های ۳ تا ۶ نمونه های مثبت از نظر وجود هر دو ژن *mecA* و *16SrDNA*، ستون ۷ کنترل منفی، ستون ۸ تا ۱۱ نمونه مثبت از نظر وجود ژن *16SrDNA* و منفی از نظر وجود ژن *mecA*.

بحث:

این مطالعه با هدف بررسی و مقایسه مقاومت به متی سیلین به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی در باکتری های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس جدا شده از نمونه های بیمارستان های آموزشی شهرکرد طراحی و اجرا گردید.

از همان زمان شروع استفاده از پنی سیلین های نیمه صناعی مقاوم به بتالاکتاماز در دهه ۱۹۶۰، به سرعت مقاومت به این داروها از جمله متی سیلین گسترش پیدا کرد و با توجه به قابلیت انتقال ژن مربوطه (*mecA*) از استافیلوکوکوس اورئوس به انواع کوآگولاز منفی استافیلوکوکوس ها و بالعکس و همچنین اثبات

قابلیت بیماریزا بودن استافیلوکوکوس های اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس به خصوص در ایجاد عفونت های بیمارستانی و بیماران با ضعف سیستم ایمنی، بررسی میزان مقاومت به متی سیلین جهت درمان صحیح بیماران اهمیت پیدا کرد (۹، ۱۰). تعیین مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی در آزمایشگاه های بالینی همواره یکی از مشکلات اساسی بوده است. جهت تعیین حساسیت به متی سیلین به روش فنوتیپی در مطالعات مختلف از آزمایشات Disk diffusion، MIC، Broth microdilution و Agar screen استفاده می شود (۸). در این مطالعه از روش Disk diffusion

استفاده شد که از بین ۱۵۰ ایزوله مورد بررسی، ۷۰ ایزوله در بررسی فنوتیپی به متی سیلین مقاوم بودند. در بررسی ژنوتیپی با روش Multiplex PCR نیز ۶۴ ایزوله دارای ژن *mecA* تشخیص داده شد.

میزان مقاومت به متی سیلین در مناطق مختلف دنیا متفاوت است. به عنوان مثال، مطالعات گسترده ای که در آمریکا بین سال های ۱۹۹۵-۱۹۹۷ بر روی ۴۳۷۸۹ کشت خون انجام شد، میزان مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی را ۵۸٪ گزارش نمودند (۲۲)؛ همچنین طبق گزارش پایگاه داده SENTRY، میزان مقاومت به متی سیلین بین سال های ۱۹۹۷-۱۹۹۹ در بین کشورهای اروپایی متفاوت بوده و به طور کلی در نقاط مختلف دنیا از جمله کانادا، ایالات متحده آمریکا، آمریکای لاتین، اروپا و غرب اقیانوس آرام حدود ۷۰٪ گزارش شده است (۲۳). در مطالعه ای در کشور تونس بر روی استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی مشخص شد مقاومت به پنی سیلین G و متی سلین ۶۰٪ بوده است. میزان ژن *mecA* نیز ۶۵٪ گزارش شده است (۱۵). در تحقیق مشابه در بیمارستان شریعتی و مرکز طبی کودکان تهران، از تعداد ۸۵ سویه استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی و ۷۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده با روش فنوتیپی ۶۲ سویه استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی و ۲۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس به آگراسیلین مقاوم بودند؛ اما در روش PCR، ۶۳ سویه استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی و ۲۸ سویه استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن *mecA* بودند (۲۴). بر اساس مطالعه ای که بر روی ۲۰۴ نفر از پرسنل بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد، ۲۳ سویه از ۵۲ سویه (۴۴٪) استافیلوکوکوس اورئوس و ۷۰ سویه از ۱۵۲ سویه (۴۶٪) استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی با روش Agar screen نسبت به آگراسیلین مقاوم بودند. با روش PCR ۲۷ سویه از ۵۲ سویه (۵۲٪) استافیلوکوکوس اورئوس و ۸۰ سویه از ۱۵۲ سویه (۵۲/۵٪) استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی دارای ژن *mecA* بودند (۲۵). در پژوهشی دیگر که به منظور

بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انجام شد، نتایج روش PCR حاکی از آن بود که از ۷۳ نمونه بالینی، ۸۹ درصد ایزوله ها دارای ژن مقاومت به متی سیلین بودند؛ ولی در بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار، فقط ۷۴ درصد ایزوله ها مقاومت را نشان دادند (۲۶).

درصد مقاومت و حضور ژن *mecA* در ترکیه کمی متفاوت گزارش شده است. طی مطالعه ای که در ترکیه توسط Duran و همکارانش انجام شد، از ۱۳۹ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده ۱۶/۵٪ مقاوم به متی سیلین بوده و میزان ژن مقاومت *mecA* هم ۲۵/۹٪ بوده است. این درحالی است که تعداد نمونه های CoNS ۱۵۹ مورد و میزان مقاومت به متی سیلین و حضور ژن *mecA* به ترتیب ۱۸/۹ و ۲۹/۶ درصد بوده است. در این مطالعه، همزمان مقاومت های چندگانه به سایر آنتی بیوتیک ها با روش Multiplex PCR هم بررسی شده است و در نهایت به این نتیجه رسیده اند که الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی با نتایج به دست آمده به روش ژنوتایپینگ بوسیله Multiplex PCR مشابه نمی باشد (۱۴).

همانطور که در اغلب تحقیقات ذکر شده مشخص است، میزان شیوع ژن *mecA* (مقاومت ژنوتیپی) بیشتر از میزان مقاومت به روش های فنوتیپی گزارش شده است. دلیل این امر این است که اغلب موارد مقاومت به متی سیلین به صورت هتروژنوس است، به این مفهوم که در هر جمعیت سلولی تنها تعداد کمی از سلول ها (10^{-8} - 10^{-4})، ژن مقاومت به متی سیلین (*mecA*) را بیان می کنند و طی بررسی های فنوتیپی مشخص شده است که بقیه جمعیت حتی در حضور غلظت بالایی از دارو (50 g/ml آگراسیلین) هم رشد می کنند (اکثریت سلول های حساس با مقاومت نسبتاً پایین ظاهر می شوند)؛ بنابراین همه سویه های مقاوم به متی سیلین ممکن است با روش های فنوتیپی قابل تشخیص نباشند و به صورت منفی کاذب گزارش شوند و همین امر باعث اختلاف در نتایج روش های ژنوتیپی و

فوتیپی سنجش مقاومت به متی سیلین می شود (۸،۱۴). در بعضی تحقیقات چه در ایران و چه در کشورهای دیگر نیز بر عکس این نتایج گزارش شده و میزان مقاومت به متی سیلین به روش فوتیپی، بالاتر گزارش شده است (۲۷-۲۹).

نکته ای که در مطالعات ذکر شده و در دیگر منابع عیان است، درصد بالاتر میزان مقاومت به متی سیلین و ژن *mecA* در استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس است. مقاومت به متی سیلین اساسا مربوط به بیان ژن *mecA* می باشد. ژن *mecA* بر روی کاست کروموزومی استافیلوکوکوسی (SCCmec) قرار دارد. استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی مقاوم به متی سیلین ممکن است به عنوان یک ذخیره بزرگ SCCmec برای استافیلوکوکوس اورئوس نیز عمل نموده و باعث انتقال ژن مقاومت به آن شوند (۹،۱۰). پس علاوه بر مشکلات ایجاد شده توسط خود استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی، مسئله انتقال ژن مقاومت و تشدید بحران در مورد مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به متی سیلین، اهمیت پرداختن به تحقیق در مورد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس را دو چندان می کند. نمونه هایی از افزایش مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس ذکر شده است.

در تحقیقی که در سه بیمارستان در ایران انجام شد، میزان مقاومت به متی سیلین را با سه روش، مورد سنجش قرار گرفت. نتایج کار به این صورت بوده که فراوانی مقاومت به متی سیلین با روش انتشار از دیسک، رقیق سازی در آگار و PCR به ترتیب ۵۰٪، ۴۷٪ و ۴۸٪ بوده است؛ همچنین سویه های *mec* مثبت نسبت به آنتی بیوتیک های آزمایش شده بسیار مقاوم تر از سویه های *mec* منفی بوده اند. در این مطالعه، میزان مقاومت به وانکوماسین، صفر گزارش شده است (۲۷). نتایج تحقیق مذکور که مشابه نتایج تحقیق حاضر است و حاکی از بیشتر بودن میزان

مقاومت در روش فوتیپی می باشد، مشخص می کند که آزمایش انتشار دیسک یا آنتی بیوگرام که به طور گسترده در آزمایشگاه های تشخیصی انجام می شود، می تواند نتایج مثبت کاذب هم در برداشته باشد. مقدار باکتری تلقیحی، قطر محیط کشت و دیسک های مورد استفاده همه می توانند در نتایج این آزمایش تأثیرگذار باشند (۲۷)؛ بنابراین برای دستیابی به نتایج دقیق، ردیابی ژن *mecA* بوسیله Multiplex PCR مطمئن تر است.

در تحقیق مشابهی که توسط Choi و همکاران در کره انجام شده میزان مقاومت به متی سیلین در روش فوتیپی ۶۶٪ و در روش ژنوتیپی ژنوتیپی (حضور ژن *mecA*)، ۵۸/۶۹٪ اعلام شده است. علت کمتر بودن در صد بیان ژن *mecA* به نسبت وجود مقاومت فوتیپی مکانیسم های غیر وابسته به PBP2a از جمله تولید بیش از حد بتا لاکتاماز و همچنین تغییر نوع پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBP) ذکر شده که ممکن است در بیان مقاومت نقش داشته باشند (۲۹). در همین راستا Secchi و همکارانش بیان کردند که تست های حساسیت فوتیپی برای تعیین مقاومت به متی سیلین در CoNS مشکلاتی را دارند که می تواند به دلیل بیان متفاوت ژن در تعدادی از سویه ها باشد که متأثر از شرایط رشد و خصوصیات عوامل بتا لاکتام مورد استفاده می باشد (۲۸).

میزان بالاتر مقاومت به متی سیلین در بین بیماران بیمارستان هاجر(س) نسبت به بیمارستان آیت الله کاشانی، می تواند به عواملی چون قدمت طولانی تر بیمارستان هاجر(س) و در نتیجه فرسایش بیشتر ساختمان و وسایل این مرکز به نسبت بیمارستان آیت الله کاشانی باشد که بواسطه تجدید بنا و تجهیزات مربوطه، عمر جوان تری دارد. از طرفی بیمارستان هاجر(س) دارای بخش های عفونی، همدیالیز، دیالیز صفاقی، پلاسمافرزیز، تالاسمی، شیمی درمانی، زنان و زایمان، نوزادان و اطفال می باشد که بیماران دچار ضعف ایمنی، خطر پذیر و مستعد انواع عفونت ها در این بخش ها به وفور حضور دارند. عوامل ذکر شده و

پیشگیری و کنترل عفونت‌های بیمارستانی ناشی از سویه‌های مقاوم استافیلوکوکوس، شستشوی صحیح و دقیق دست‌ها، عملی‌ترین و ساده‌ترین راه می‌باشد (۱۶).

نتیجه گیری:

در بررسی مقاومت به متی سیلین استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی به روش انتشار از دیسک مقدار باکتری تلقیحی، قطر محیط کشت و دیسک‌های مورد استفاده همه می‌توانند در نتایج این آزمایش تأثیر گذار باشند؛ بنابراین برای بررسی دقیق میزان مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ردیابی ژن *mecA* بوسیله Multiplex PCR مطمئن تر است. سنجش مقاومت فنوتیپی به روش انتشار از دیسک ممکن است بخاطر موارد مثبت و منفی کاذب دقیق نباشد. در این مطالعه میزان سمقاومت به متی سیلین در *CoNS* نسبت به متوسط مطالعات صورت گرفته در ایران که حدود ۵۰ درصد می‌باشد، کمتر بود که نشان می‌دهد رعایت شاخص‌های کنترل عفونت در این مراکز، از میانگین کشوری بالاتر است؛ همچنین استافیلوکوکوس‌های مورد مطالعه به خوبی به داروی وانکومايسين حساسیت نشان دادند؛ بنابراین استفاده بجا و محتاطانه از این دارو در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از تمام کسانی که در طراحی و اجرای این مطالعه همکاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید لازم به ذکر است این مقاله مستخرج از پایان نامه شماره ۱۵۴۳۰۵۰۷۹۲۱۰۰۲ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم می‌باشد.

شاید عوامل ناشناخته دیگری، احتمال ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی و احتمال افزایش شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و از جمله متی سیلین را افزایش می‌دهد.

بررسی مقاومت به وانکومايسين نشان از حساسیت بالای این دارو برای استافیلوکوکوس‌های اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس بود. در تحقیق پیرایه و همکاران نیز میزان مقاومت به وانکومايسين صفر گزارش شد (۲۷). در مطالعه عبدالهی و همکاران از میان ۱۶۴ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده تعداد ۷۸ مورد به متی سیلین مقاوم بودند. در این مطالعه هیچ موردی از مقاومت به وانکومايسين شناسایی نشد، در حالی که نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت وجود داشت (۳۰).

در تحقیق انجام شده در ترکیه نیز میزان مقاومت به وانکومايسين هم در *CoNS* و هم در استافیلوکوکوس اورئوس صفر گزارش شد (۱۴). در مطالعه ی مشابه در تبریز با بررسی ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، میزان مقاومت به متی سیلین ۸۵٪ و حضور ژن *mecA* ۸۹٪ اعلام شد و نتایج نشان داد که همه ۱۰۰ نمونه به وانکومايسين حساس بوده اند (۳۱). در تحقیق حاضر نیز فقط دو مورد مقاومت نسبت به وانکومايسين مشاهده شد. بنابر این می‌توان داروی وانکومايسين را یک داروی بسیار مؤثر در مقابله با استافیلوکوکوس‌ها بخصوص انواع کوآگولاز منفی محسوب کرد.

چنانچه وانکومايسين به همراه ریفامپین یا جنتامایسین مصرف شود اثربخشی آن بیشتر می‌شود. با این حال نباید در مصرف وانکومايسين افراط نمود؛ چرا که مصرف بی رویه آن سبب افزایش جمعیت انتروکوک‌های واجد پلاسمید حاوی ژن مقاومت به وانکومايسين خواهد شد و احتمال این که این پلاسمیدها از طریق کونژوگاسیون به سویه‌های استافیلوکوکوس انتقال یابد افزایش می‌یابد. به منظور

منابع:

1. John JF, Harvin AM. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. *Ther Clin Risk Manag.* 2007; 3(6): 1143-52.
2. Razavi Sh, Rastegar Iari A, Ghazi F. Molecular subtyping of coagulase negative staphylococcus by pulse field gel electrophoresis: First report. *Med J Tabriz Uni Med Sci.* 2006; 28(3): 53-7.
3. Javadpour S, Karimi E, Karmostaji A. Frequency and anti-biogram pattern of coagulase negative Staphylococcus in clinical specimens of Shahid Mohammadi Hospital in patients, Bandar-Abbas, Iran. *African J Microbiol Res.* 2010; 4(14): 1581-3.
4. Otto M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(8): 555-67.
5. Tufariello J, Lowy F. Coagulase-negative staphylococci: antimicrobial resistance and treatment. Sexton DJ, Kaplan SL, Baron EL (eds). 2012. Available from: <http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm>.
6. McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60(12): 1551-71.
7. Soderquist B, Berglund C. Methicillin-resistant Staphylococcus saprophyticus in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15(12): 1176-8.
8. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Scott EG, Bailley WR. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology.* 13th ed. Philadelphia: Mosby; 2002.
9. Zong Z, Peng C, Lu X. Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PLoS One.* 2011; 6(5): e20191.
10. Rosenthal ME, Dever LL, Moucha CS, Chavda KD, Otto M, Kreiswirth BN. Molecular characterization of an early invasive Staphylococcus epidermidis prosthetic joint infection. *Microb Drug Resist.* 2011; 17(3): 345-50.
11. Balkhy HH, Memish ZA, Almuneef MA, Cunningham GC, Francis C, Fong KC, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a 5-year review of surveillance data in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; 28(8): 976-82.
12. Bhutia KO, Singh TS, Biswas S, Adhikari L. Evaluation of phenotypic with genotypic methods for species identification and detection of methicillin resistant in Staphylococcus aureus. *Int J Appl Basic Med Res.* 2012; 2(2): 84-91.
13. Pishva E, Havaei SA, Aarsalani F, Narimani T, Azimian A, Akbari M. Detection of methicillin-resistance gene in Staphylococcus epidermidis strains isolated from patients in Al-Zahra Hospital using polymerase chain reaction and minimum inhibitory concentration methods. *Adv Biomed Res.* 2013; 2: 23.
14. Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. *Indian J Med Res.* 2012; 135: 389-96.
15. Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A. Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase-negative Staphylococci other than Staphylococcus epidermidis isolated from various clinical specimens. *African J Microbiol Res.* 2011; 5(11): 1298-305.
16. Mack D. Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation. *J Hosp Infect.* 1999; 43(Suppl): 113-25.
17. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology.* 26th ed. New York: McGraw Hill; 2007. pp: 224-230.
18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Review of medical microbiology Murray.* Translated to Persian by: Bahador A. Tehran: Khosravi Pub; 2010. p:135-136.
19. Zamanzad B, Karimi A. *Medical bacteriology laboratory.* 1st ed. Shahrekord: Zagros Pub; 2008.
20. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods.* 2000; 42(2): 139-47.
21. Noroozi J. *Molecular biology methods in Bacteria.* 1st ed. Tehran: Andisheh Rafie Pub; 2004.

22. Sahm DF, Marsilio MK, Piazza G. Antimicrobial resistance in key bloodstream bacterial isolates: electronic surveillance with the Surveillance Network Database--USA. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(2): 259-63.
23. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001; 32(Suppl 2): 114-32.
24. Mirsalehian A, JabalAmeli F, Kazemi B, Alizadeh SA. Comparison of disk diffusion method with polymerase chain reaction for detecting methicillin resistance in clinical isolates of Staphylococci. *Tehran Univ Med J.* 2003; 61(6): 420-5.
25. Nafisi M, Kalhor H, Zamanzad B, Karimi A, Farokhi A, 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. *Arak Univ Med Sci J.* 2008; 11: 94-101.
26. Ghorbani Tazhandare S, Imani Fooladi A, Nourani M. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by disk diffusion and molecular methods in icu and emergency sections in one of educational hospital, Tehran. *Urmia Med J.* 2013; 24(2): 110-120.
27. Najar Peerayeh S, Azimian A, Mostafae M, Siadat SD. Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by disk diffusion method, determination of MIC and PCR for mecA gene. *Modares J Med Sci.* 2009; 12(3): 61-9.
28. Secchi C, Antunes AL, Perez LR, Cantarelli VV, d'Azevedo PA. Identification and detection of methicillin resistance in non-epidermidis coagulase-negative staphylococci. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12(4): 316-20.
29. 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.
30. Abdollahi A, Koohpayeh S, Najafipour S, Mansoori Y, Abdollahi S, Jaafari S. Evaluation of drug Resistance and Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) types among methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *J Alborz Health.* 2012; 1(1): 47-52.
31. Shoja S, Nahaei MR, Nahaei M, Farajnia S, Ahangarzadeh Rezaei M, Nikvash S. Study of methicillin- resistance by oxacillin disc diffusion and pcr methods in Staphylococcus epidermidis isalates collected from blood cultures and their antibiotic susceptibility. *Med J Tabriz Uni Med Sci.* 2009; 31(1): 39-44.

Molecular investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated in Shahrekord training hospitals

Dehghan AR¹, Gholipour A^{2*}, Nazari R¹, Heibati F²

¹Microbiology Dept., Islamic Azad University of Qom, Qom Branch, I.R. Iran; ²Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 7/Jun/2014 Accepted: 29/Sep/2014

Background and aims: Coagulase-negative Staphylococci is one of the most important factors for nosocomial infections. Resistance to methicillin has been observed in this group of bacteria. This study was aimed to investigate and compare resistance to methicillin using two phenotypic and genotypic methods in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* bacteria isolated from samples in training hospitals of Shahrekord.

Methods: In this analytic descriptive study, 2900 various samples including blood, urine, and etc. were collected from patients hospitalized in Hajar (PBUH) and Ayatollah Kashani hospitals of Shahrekord. Then, 150 isolates of coagulase-negative Staphylococci were selected using microbiological experiments. In the next step, phenotypic resistance was simultaneously assessed by disk diffusion and genotypic resistance [methicillin-resistant gene (*mecA*)] by multiplex PCR.

Results: Of isolated 150 cases under study, findings showed that 46.66% of the samples (70 isolates with confidence interval of 95% equal to 38.49-54.98%) were resistant to methicillin in phenotypic analysis. Besides, in genotypic analysis 42.66% of the samples (64 isolates with confidence interval of 95% equal to 34.63-51%) had methicillin-resistant gene (*mecA*). Distribution of phenotypic and genotypic resistance in two hospitals under study was equal, and had no significant difference ($P>0.05$).

Conclusion: The genotypic results indicate the presence of methicillin-resistance gene. Genotyping through PCR is a reliable tool to show the rate of methicillin-resistance in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*.

Keywords: Genotypic resistance, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, Training hospitals.

Cite this article as: Dehghan AR, Gholipour A, Nazari R, Heibati F. Molecular investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated in Shahrekord training hospitals. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(2): 93-104.

***Corresponding author:**

Microbiology and Immunology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran,
Tel: 00989137046656, E-mail: gholipour_abolfazl@yahoo.com.