شناسایی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین با مقایسه روش‌های دیسک دیفیوژن اگزاسیلین، سفوکسیتین و PCR ژن mecA

رضا یاری[1*]، محمدرضا مهرابی[2]، نیلوفر قربانپور کیاسری[1]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
۲. گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۲۵)

چکیده

سابقه و هدف: سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) تهدیدی جدی در عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آیند. در تشخیص آنها روش PCR هزینه بر می باشد ولی روش انتشار دیسک، روشی ساده و ارزان بوده و دارای اختصاصیت بالایی می باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک های سفوکسیتین و اگزاسیلین و مقایسه آن با روش PCR برای شناسایی ژن mecA بوده است.

مواد و روش ها: دراین مطالعه ۱۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه بالینی پوست بیماران و کارکنان بیمارستان‌های شهر قم جمع آوری شد. سپس مقاومت به متی سیلین با روش های انتشار دیسک اگزاسیلین و سفوکسیتین تشخیص داده شد و با استفاده از روش PCR ژن mecA در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی گردید و داده های دو روش مقایسه شدند.

نتایج: در روش دیسک دیفیوژن اگزاسیلین ۳۳ درصد و در روش دیسک سفوکسیتین و PCR حضور ژن mecA، ۲۸ درصد ایزوله‌ها مقاوم به متی‌سیلین بودند. روش دیسک اگزاسیلین در مقایسه با دیسک سفوکسیتین در ۱۴ درصد دارای جواب کاذب (مقاومت کاذب به متی‌سیلین) در شناسایی سویه MRSA بوده است.

نتیجه گیری: در آزمایشگاه هایی که روش ملکولی به عنوان روش معمول در تشخیص MRSA استفاده نمی شود روش دیسک سفوکسیتین به عنوان روشی ساده و کم هزینه می تواند جانشینی مطلوب برای شناسایی ایزوله های مقاوم به متی سیلین باشد.

کلیدواژگان

اگزاسیلین، سفوکسیتین، MRSA، *mecA*.

* نویسنده مسئول، رایانامه: rezayari@yahoo.com

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی است که به‌طور معمول به عنوان یک عامل پاتوژن محسوب نمی‌شود اما می‌تواند عامل بسیاری از عفونت‌های پوستی، سینوسی و مسمومیت‌های غذایی باشد (۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* جز سلسله پروکاریوت رده فیرمی باکتریا، خانواده میکروکوکاسه و جنس استافیلوکوکوس می‌باشد (۲). آنها بصورت کوکسی های تنها، دوتایی، چهارتایی و خوشه انگور دیده می شوند. این باکتری ها بی حرکت، فاقد اسپور، هوازی و بیهوازی اختیاری اند. اعضاء این جنس در پوست، غدد پوستی، غشاهای مخاطی جانوران وجود دارند و به فرآورده‌های حیوانی مثل پنیر، شیر، گوشت و منابع محیطی مثل خاک و شن و گرد و غبار، هوا و آب‌های طبیعی منتقل می‌شوند. برخی از گونه‌ها برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند و برخی دیگر در فساد مواد غذایی نقش دارند (۳ و۴).

نخستین بار بروز سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) در سال ۱۹۶۱ از بیمارستان‌های اروپا گزارش شد و به دنبال آن فراوانی سویه‌های مقاوم به متی سیلین از بسیاری از کشورهای جهان نظیر کانادا، آمریکای شمالی و استرالیا گزارش گردید (۵ و۶). مقاومت آنتی‌بیوتیکی نوعی از مقاومت داروئی است که میکروارگانیسم قادر به زندگی و بقا در مجاورت یک آنتی‌بیوتیک است. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در داخل و خارج حیطه پزشکی نقش ویژه‌ای در ظهور باکتری‌های مقاوم دارد هرچند سطوح پائینی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز قبل از استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها موجود بوده است (۷).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام توسط باکتری با روش های غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با استفاده از آنزیم بتالاکتاماز، تولید پروتئین‌های جدید اتصالی به پنی سیلین که میل ترکیبی آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش می‌دهد، تغییر کانال‌های پورینی که موجب کاهش نفوذپذیری آنتی‌بیوتیک‌ها به درون سلول‌های درگیر می‌شود و فعال کردن پمپ‌های افلاکس (Efflux) که باعث خروج آنتی‌بیوتیک‌ها از سلول میزبان می‌شود، حاصل می گردد (۸).

علت اصلی مقاومت در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در پروتئین‌های باندشونده به پنی‌سیلین (PBPs: Penicillin-Binding Proteins) است. این پروتئین‌ها مسئوول ساخت دیواره سلولی باکتری بوده و مورد هدف تمام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشند. سوش‌های MRSA زیرگروه PBP2a: Penicillin Binding Protein 2a را نشان می‌دهند. PBP2a دارای وزن ۷۸ کیلودالتون می‌باشد (۹ و۱۰).

PBP2a میل ترکیبی کمی با بتالاکتام‌ها دارد و سبب مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به بتالاکتام‌ها می گردد. تولید این پروتئین جدید با ژن‌های *mec* موجود در کروموزوم باکتری مرتبط است و بروز سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین MRSA *استافیلوکوکوس اورئوس* از معضلات درمانی در بیماران است. PBP2a توسط ژن *mecA* رمزگذاری می‌شود و با کاست بزرگ ژنی *SCCmec* (Staphylococcal Cassette Chromosome mec) که متحرک است، حمل می‌شود. این کاست متشکل از سه قسمت J.region، mec complex، ccr complex می‌باشد. براساس خصوصیات این منطقه ژنی پنج تیپ اصلی از SCCmec (تیپ های I- VI) وجود دارد؛ تیپ‌های (۲۰/۹ Kb) VI و (۲۸ Kb) V و (۲۴/۳Kb to ۲۰/۹) IV و (۳۴/۳ Kb) I عمدتاً سبب مقاومت به متی‌سیلین و سایر بتالاکتام‌ها می‌شوند در حالی که تیپ‌های (۶۶/۹ Kb)III و (۵۳/۰ Kb)II غالباً باعث ایجاد مقاومت‌های چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و غیربتالاکتامی می‌گردند (۱۱ و۱۲).

حضور ژن *mecA* منجر به بروز *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و عدم حضور آن، *استافیلوکوک اورئوس*‌های حساس به متی‌سیلین را ایجاد می‌کند. طول ژن *mecA* ۲/۱ kb می‌باشد. این ژن اغلب به صورت هتروژن در استافیلوکوکوس‌ها بیان می‌شود و بیان هتروژن مقاومت به متی سیلین بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند ارزیابی میزان مقاومت را با استفاده از روش‌های فنوتیپیک با چالش جدی مواجه کند زیرا میزان بیان ژن *mecA* در گونه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین یکسان نیست (۱۳). یافتن ژن *mecA* از طریق واکنش زنجیره پلیمر از (PCR) "استاندارد طلایی" برای پی بردن به مقاومت متی‌سیلین است. اپرونmec شامل ژن ساختاری *mecA* و ژن‌های تنظیم رونویسی *mecI* و*mecR1* می‌باشد. تنظیم رونویسی ژن *mecA* تحت کنترل عناصر تنظیمی دخیل در تولید بتالاکتاماز یعنی blaI و blaR1 نیز می‌باشد (۱۴، ۱۵، ۱۶و۱۷).

جداسازی ژن *mecA* یک مارکر ملکولی مفید برای شناسایی مقاومت به اگزاسیلین در استافیلوکوک بوده و می‌تواند مستقل از شرایط محیط کشت شناسایی شود (۱۸).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از اردیبهشت تا مهر ۹۳، ۱۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه بالینی پوست بیماران و کارکنان بیمارستان‌های نکوئی(هدایتی)، شهیدبهشتی، کامکار شهر قم صرفاً بعنوان فلور نرمال جمع آوری شد. سپس با روشهای رنگ آمیزی گرم، بیوشیمیایی افتراقی(تست‌های کاتالاز، کوآگولاز، MSA، DNase) و PCR ناحیه srRNA ۱۶ اقدام به شناسایی دقیق ایزوله‌ها گردید. پس از تشخیص هویت باکتری‌ها در محیط TSB فریز شدند. از این محیط برای نگهداشتن باکتری‌ها در مدت زمان طولانی در دماهای ۲۰- و ۷۰- درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. این محیط دارای ۸۰ درصد TSB و ۲۰ درصد گلیسرول است.

روش ملکولیPCR ژن ۱۶ s rRNA و *mecA*

قبل از انجام PCR استخراج DNA باکتری لازم است، به این منظور از کیت استخراج DNA گرم مثبت شرکت سینا کلون استفاده شد. پس از تخلیص ژنوم باکتری به منظور شناسایی ژنهای *۱۶ srRNA* و *mecA* از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (جدول ۱). برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر (Biorad USA PCR T100) و برنامه دمایی-زمانی جدول ۲ استفاده شد. ترکیبات مورد نیاز واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر طبق جدول ۳ تهیه و آماده گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق و طول محصول PCR

منبع	طول امپلیکون	توالی از ′۵ به ′۳	نام پرایمر
۱۴	۴۷۹	ggaattcaaatgaattgacggggg	16s rRNA
		cgggatcccaggcccgggaccgtattcac	16s rRNA
۲۰	۱۰۴۶	ggtcccattaactctgaag	*mecA F*
		agttctgcagtaccggatttgc	*mecA R*

جدول ۲- برنامه دمایی-زمانی واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر

چرخه	زمان	دما(°C)	مراحل
۱	(min)۵	۹۵	Initial Denaturation
۳۴	(Sec) ۳۰	۹۳	Denaturation
	(Sec)۴۰	۴۳ برای ژن *16 s* / ۴۵ برای ژن *mecA*	Annealing
	۴۰ (Sec) برای ژن *16 s* / ۷۰ (Sec) برای ژن *mecA*	۷۲	Extension
۱	(min)۱۰	۷۲	Final extension

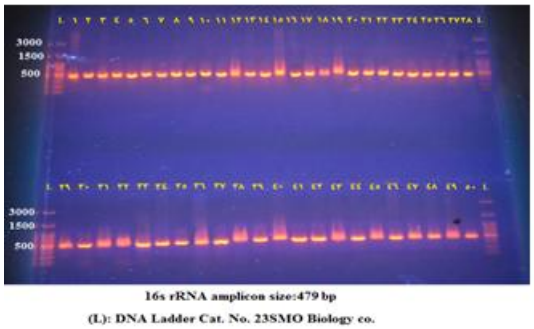
جدول ۳- اجزاء مورد نیاز برای انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر

ترکیبات	غلظت
ddH2O(DW)	ـــــ
Buffer 10X	۱x
MgCl2	۱/۵ mM
dNTP	۰/۲ mM
Primer	۰/۶ mM
Taq polymerase	۱/۰ U
DNA	۲۰ ng

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها با روش استاندارد Kirby & Bauer برای همه ایزوله ها انجام گرفت. محیط مولر هینتون آگار بعنوان محیط انتخابی برای انجام آزمایش به کار رفت. همچنین از دیسک اگزاسیلین از شرکت Mast انگلستان و دیسک سفوکسیتین پادتن طب برای تشخیص سویه های مقاوم به متی سیلین استفاده گردید. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی در این آزمایش به کمک سواب از ۳-۴ کلنی باکتری کشت تازه خالص شده برداشت شد و داخل یک لوله حاوی سرم فیزیولوژی بصورت سوسپانسیون درآورده تا کدورتی به اندازه کدورت لوله استاندارد (محلول۰/۵ مک فارلند) به دست آید. بعد از فرو بردن سواب استریل در سوسپانسیون باکتری، اضافه محلول را با فشار دادن سواب به کناره لوله گرفته و سپس در سطح پلیت در حالت زاویه ۶۰ درجه نسبت به هم پخش و در آخر سواب را دور قسمت داخلی پلیت چرخانده و سپس داخل ماده ضدعفونی‌کننده قرار داده شد. دیسک های آنتی‌بیوتیک را با پنس استریل در سطح محیط کشت و با فاصله از لبه پلیت با دقت قرار دادیم. پلیت ها را در حرارت ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت قرار داده و پس از آن با استفاده از خط کش دقیق و دستگاه ویژه محاسبه قطر هاله، هاله عدم رشد را بر حسب میلی متر اندازه گرفته شد، با استفاده از جدولCLSI[1]، میزان حساسیت باکتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بصورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید. *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923[2] به عنوان کنترل در این آزمایش استفاده شد.

یافته ها:

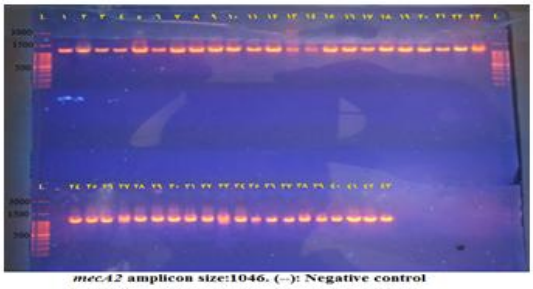
با آزمایش های رنگ آمیزی گرم، بیوشیمیایی افتراقی(تست‌های کاتالاز، کوآگولاز، MSA[3]، DNase) و PCR ناحیه srRNA ۱۶ هویت ۱۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* تایید شد (شکل ۱-الف).



شکل ۱- الف: ژل الکتروفورز PCR امپلیکون bp ۴۷۹ ژن *16srRNA*

در آزمایش سنجش حساسیت ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* تعداد ۵۰ ایزوله به عنوان ایزوله های مقاوم به اگزاسیلین و ۴۳ ایزوله نیز به عنوان مقاوم به سفوکسیتین طبق دستورالعمل CLSI شناسایی شدند. ۴۳ ایزوله مقاوم به سفوکسیتین به اگزاسیلین نیز مقاوم بودند. تعداد ۵۰ ایزوله با این دو روش به عنوان MRSA شناسایی شدند. در واکنش PCR ۷ ایزوله مقاوم به اگزاسیلین فاقد ژن *mecA* (مثبت کاذب) بودند. تعداد ۴۳ ایزوله مقاوم به سفوکسیتین با روش PCR به عنوان MRSA تشخیص قطعی داده شدند (شکل ۱-ب و جدول۴).

1. The Clinical and Laboratory Standards Institute
2. American Type Culture Collection
3. Mannitol salt agar



شکل ۱- ب: ژل الکتروفورز PCR امپلیکون bp ۱۰۴۶ ژن *mecA*

جدول ٤- مقایسه روش دیسک دیفیوژن و PCR

روش	MRSA(+)	حساسیت	اختصاصیت
دیسک اگزاسیلین	۵۰	٪۸۶	٪۸۶
دیسک سفوکسیتین	۴۳	٪۱۰۰	٪۱۰۰
PCR شناسایی ژن *mecA*	۴۳	٪۱۰۰	٪۱۰۰

بحث

افزایش میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیک ها یکی از مشکلات جدی در سیستم های مراقبت بهداشتی در جهان هستند و بیماری های عفونی دومین عامل جدی مرگ و میر در سرتاسر دنیا می باشد (۷). شناسایی ژن *mecA* با استفاده از روش PCR شیوه استاندارد طلایی برای تایید *استافیلوکوکوس اورئوس* به متی سیلین مقاوم می باشد (۲۱). مطالعات اخیر نشان داده اند که روش دیسک سفوکسیتین نسبت به دیگر روش های فنوتیپی مانند اگزاسیلین ارجحیت دارد (۲۲) و امروزه روش توصیه شده توسط CLSI است (۲۳). جان و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی ۱۳۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند که حساسیت و اختصاصیت روش استفاده از دیسک سفوکسیتین به ترتیب در هر دو مورد برابر ۱۰۰٪ بود (۲۴). در مطالعه آناد و همکاران در سال ۲۰۰۹ تمامی ۳۲ ایزوله که در روش دیسک دیفیوژن نسبت به سفوکسیتین مقاوم بودند در روش PCR نیز ژن *mecA* داشتند (۲۵). ماتوس و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* خود نشان دادند که حساسیت و اختصاصیت روش استفاده از دیسک سفوکسیتین برای شناسایی MRSA، به ترتیب در هر دو مورد برابر ۱۰۰٪ بود(۲۶). همچنین در مطالعه سبحانی پور و همکاران در سال ۱۳۹۰ از ۵۶۷ نمونه، ۲۲۶ ایزوله (۳۹/۸ درصد)، *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شد. ۲۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۱/۱ درصد) به دیسک یک میکروگرمی اگزاسیلین مقاوم و ۷ ایزوله (۳/۱ درصد) واکنش نیمه حساس داشتند. با توجه به مقاومت غیر همگن نسبت به اگزاسیلین، *استافیلوکوکوس اورئوس* نیمه حساس نیز به عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. در مجموع ۳۲ ایزوله (۱۴/۲ درصد) نسبت به اگزاسیلین مقاوم گزارش شد. در روش سفوکسیتین ۴۴ ایزوله(۱۹/۴۶ درصد) مقاوم بودند. تفاوت آماری معنی دار بین این دو شیوه وجود نداشت (P=۰/۱۳). تعداد ۵۰ ایزوله (۲۲/۱ درصد) با این دو روش به عنوان MRSA شناسایی شدند. ۳ ایزوله مقاوم به اگزاسیلین و ۴ ایزوله مقاوم به سفوکسیتین فاقد ژن *mecA* (مثبت کاذب) بودند. تعداد ۴۳ ایزوله (۱۹ درصد) به روش PCR به عنوان MRSA تشخیص قطعی داده شدند. همه ایزوله های MRSA (۱۰۰ درصد) حساس به ونکومایسین بودند (۲۷). در مطالعه حاضر ۱۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس*، مورد بررسی قرار گرفتند. ۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* (معادل ۳۳/۳۳ درصد) به دیسک اگزاسیلین مقاوم بودند. در روش سفوکسیتین ۴۳ ایزوله(معادل ۲۸/۶۷ درصد) مقاوم بودند. تعداد ۵۰ ایزوله (۳۳,۳۳) با این دو روش به عنوان MRSA شناسایی شدند. ۷ ایزوله مقاوم به اگزاسیلین فاقد ژن *mecA* (مثبت کاذب) بودند. تعداد ۴۳ ایزوله به روش PCR به عنوان MRSA تشخیص قطعی داده شدند. حساسیت و اختصاصیت روش استفاده از دیسک سفوکسیتین برای شناسایی MRSA، به ترتیب در هر

دو مورد برابر ۱۰۰٪ درصد بود. نتایج بیان می دارد که روش دیسک سفوکسیتین نسبت به روش دیسک اگزاسیلین دقیق تر و حساس تر است و مانع بروز مثبت کاذب می شود که این مورد با انجام PCR اختصاصی به تایید نهایی رسید.

نتیجه گیری نهایی

طبق نتایج به دست آمده از دو روش دیسکی مشخص گردید که روش دیسک اگزاسیلین در مقایسه با دیسک سفوکسیتین دارای مقاومت کاذب به متی سیلین در شناسایی سویه های استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین بوده و دیسک سفوکسیتین می تواند به عنوان روشی ساده، کم هزینه، بدون نیاز به دستگاه گران قیمت ترموسایکلر، جانشینی مطلوب برای شناسایی ایزوله های مقاوم به متی سیلین باشد. در نتیجه می توان در مراکز فاقد روش ملکولی PCR به منظور جلوگیری از گزارش مثبت کاذب از دیسک دیفیوژن سفوکسیتین استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از آقای لدنی کارشناس محترم آزمایشگاه بیولوژی سلولی ملکولی دانشگاه آزاد واحد بروجرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر به عمل می آید.

منابع و مآخذ

1. Zamanian Azodi M, Ardeshirylajimi A, Ahmadi N, Guilanchi S, Abasi N, Hematian A. The study of antibiotic properties of scrophularia striata aqueous extract on *Staphylococcus aureus*. J Ilam Univ Med Sci. 2012. 20(4): 76-82. [in Persian]
2. Eslami M, Koohi MK, Zadehashem E, Khadiri B, Keshavarz H. Survey the presence of coagulase positive *Staphylococcus aureus* in cottage cheeses produced from sheep milk and in marand county. Food Sci Tech J. 2014. 12(46): 211-218. [in Persian]
3. Imani Fooladi AA, Riazipour M, Sattari M. Molecular and serological detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from traditionally dairy products. Shahrekord Univ Med Sci J. 2009. 11(4): 19-27. [in Persian]
4. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniq ues for identifyngan quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterial. Eur Cell and Mater J. 2002. 31(4): 39-60.
5. Amini D, Keshavarzi F, Fattahy Rad A. Comparison phenotypic methods with *mecA* gene analysis for the detection of methicillin/oxacillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in sanandaj city. Ilam Uni of Med Sci J. 2014. 22(4): 109-122. [in Persian]
6. Jyothi Lakshmi G. Mechanism of resistance, phenotyping and genotyping of methicillin resistant *Staphylococcus aureus.* Curr Microbiol Appl Sci J. 2015. 4(3): 810-818.
7. Zia MZ, Beheshti S, Khalkhali H, Saffari S. Detection of antibiotic resistance in different strains of *staphylococcus aureus* using disc diffusion agar. Razi Med Sci J. 2013. 20(111): 71-78. [in Persian]
8. Rao PN. Extended spectrum beta-lactamases. 2012. 1-34. www.microrao.com.
9. Rahimi F, Karimi S. Antibiotic resistance pattern and prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from chicken husbandries in tehran. Iran Infec Dis J. 2013. 18(62): 17-22. [in Persian]
10. Plata K, Rosato AE, Węgrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biomate J. 2009. 56(4): 597-612.
11. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, Sarmadyan H, Ghaznavi Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. Arak Med Univ J. 2013. 16(2): 29-37. [in Persian]
12. Sobhani Poor MH, Mansouri S, saeid adeli N. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Antibiotic Resistance Patterns of the Isolates from the Nose of Training Soldiers in Kerman in 2012. Iran J Med Microbiol. 2014. 8(3): 15-21. [in Persian]
13. Rezaei M, Moniri R, Piroozmand A, Mousavi GA. Diagnostic value of cefoxitin susceptibility test compared with other diagnostic methods of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Kashan Univ Med Sci J. 2013. 17(4): 394-399. [in Persian]
14. Javan A, Falahati HR, Saifi M, Talebi M, Ebrahimpour G, Pourshafi MR. *mecA* Gene Among High Level Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated From Tehran Hospitals. Iran J Infect Dis Trop Med. 2010. 15(49): 17-22. [in Persian]
15. Hoseini S, Niakan M, Saderi H, Emaneini M. Comparison of cefoxitin disk diffusion and PCR for *mecA* gene methods for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Shahed Univ. 2014. 22(114): 41-46. [in Persian]
16. Montazeri EA, Khosravi AD, Jolodar A, Ghaderpanah M, Azarpira S. Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR**.** J Burns. 2015. 41(3): 590-594. [in Persian]

17. Dibaj R, Shoaei P, Hashemi A, Daei Naser A, Shojaei H. Study of Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* and CA-MRSA Nasal Colonization in 2-5 Years Old Children in Isfahan. Iran J Med Microbiol. 2014. 8(3): 22-30.

18. Shoja S, Nahaei M, Farajnia S, Ahangarzadeh Rezaee M, Nikvash S. Comparison of Oxacillin Agar Screening and PCR Methods in Detection of Methicillin Resistance *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Blood Cultures of Children . Iran J Med Microbiol. 2008. 1(4): 13-20. [in Persian]

19. Nafisi MR, 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. Arak Univ of Med Sci J. 2008. 11(2): 94-101. [in Persian]

20. Pentinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G, spiliopoulou I. Detection of *mecA, mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. Antimicrob Chemother J. 2001. 47(3): 997-304.

21. Skov R, Smyth R, Larsen AR, Bolmstrom A, Karlsson A, Mills K, Frimodt Moller N, Kahlmeter G. Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and Etest on mueller-hinton agar. Clin Microbiol J. 2006. 44(12): 95-99.

22. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt Moller N, Olsson Liljequist B, Kahlmeter G. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on iso-sensitest agar for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Chemother J. 2003. 52: 204-207.

23. Patel JB, Cockerill FR, Alder J, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hardy DJ, Hindler JA, Jenkins SG, Lewis JS, Miller LA, Powell M, Swenson JM, Traczewski MM, Turnidge JD, Weinstein MP, Zimmer BL. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI J. 2014. 34(1): 1-226.

24. John MA, Burden J, Stuart JI, Reyes RC, Lannigan R, Milburn S, et al. Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in Staphylococcus spp. reveals a species-dependent performance. Antimicrob Chemother J. 2009. 63(3): 493–496.

25. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. Indian Med Microbiol J. 2009. 27(1): 27-9.

26. Matos PD, Schuenck RP, Cavalcante FS, Caboclo RM, dos Santos KR. Accuracy of phenotypic methicillin susceptibility methods in the detection of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different SCC*mec* types. Mem Inst Oswaldo Cruz J. 2010. 105(7): 931-934.

27. Sobhani Poor MH, Mansouri S, saeid adeli N. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and antibiotic resistance patterns of the isolates from the nose of training soldiers in kerman in 2012. Iranian Med Microbiol J. 2014. 8(3): 15-21. [in Persian].