مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۴، شماره ۲
خرداد-تیر ۱۴۰۰، صفحه ۲۹۲۴-۲۹۱۴

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 64, No.2 P: 2914-2924
May-Jul 2021

مقاله اصلی

دسته بندی ژنتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در استان چهارمحال و بختیاری بر پایه ژن coa

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۲۴- تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۰۴

زهرا عسگری [۱]
حسن ممتاز [۲*]

[۱] دانش آموخته ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲] گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد

Email: hamomtaz@yahoo.com

خلاصه

مقدمه: روش‌های مختلفی نظیر ژنوتایپینگ بر اساس ژن coa (coa typing) و روش‌های مبتنی بر PCR جهت دسته بندی ژنتیکی استافیلوکوکوس اورئوس به کار رفته است. در مطالعه حاضر از ردیابی ژن coa جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد.

روش کار: تعداد ۲۲۰ نمونه عفونی شامل خلط(۵۲ نمونه)، ادرار (۸۶ نمونه)، چرک(۶۸ نمونه)، خون(۱۴ نمونه) از بیماران بستری در بخش عفونی بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال وبختیاری در یک دوره زمانی ۶ ماهه از دی ماه ۱۳۹۷ تا تیر ماه ۱۳۹۸ جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل گردید.

نتایج: از ۲۲۰ نمونه بالینی اخذ شده از شایع ترین عفونت های بیمارستانی در بیماران بستری در بیمارستان های سطح استان چهارمحال و بختیاری، تعداد ۹۲ نمونه (۴۱/۸۱ درصد) آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند و در ۴۶ ایزوله ژن کد کننده کواگولاز ردیابی شد. بر اساس قطعه باندی تکثیر یافته از تکثیر ژن Coa در ایزوله های Coa^{+} جدا شده، چهار ژنوتیپ I تا IV از ژن Coa شناخته شد بدین صورت که ۲۹ ایزوله در تیپ CoaI ، ۹ ایزوله در ژنوتیپ coaII، ۳ ایزوله در ژنوتیپ CoaIII و ۵ ایزوله در ژنوتیپ CoaIV قرار گرفتند. در آزمایش RFLP با استفاده از آنزیم AluI در ایزوله های متعلق به تیپ CoaI سه قطعه ۱۴۰،۱۷۰،۲۱۰ جفت بازی، در ایزوله های متعلق به تیپ CoaII دو قطعه ۴۵۰و ۲۶۰ جفت بازی ودر ایزوله های مربوط به تیپ CoaIV سه قطعه ۴۵۰،۱۷۰،۲۱۰ جفت بازی مشاهده شد اما در ایزوله های متعلق به تیپ CoaIII باندی از هضم آنزیمی یافت نشد.

نتیجه‌گیری: در مجموع PCR-RFLP ژن Coa یک روش سریع و قابل اعتماد در شناسایی و تیپ بندی مولکولی ایزوله های استاف ارئوس بوده و شیوع بالای ژنوتیپ CoaI در ایزوله های جدا شده از انواع عفونت های بالینی نشانگر این است که این تیپ می‌تواند منبع بالقوه ای از انتشار استافیلوکوکوس ارئوس در جامعه باشد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، عفونت های بیمارستانی، ژنوتایپینگ، ژن coa، استان چهارمحال و بختیاری.

مقدمه

استافیلوکوک تنها جنس در خانواده میکروکوکاسه می‌باشد که اهمیت پزشکی دارد. علی رغم استفاده از انواع عوامل ضدمیکروبی و بهبود سطح بهداشت (که نقش مؤثری در کاهش شیوع و مرگ‌ومیر بیماری‌های استافیلوکوکی در قرن بیستم داشته است) هنوز استافیلوکوک‌ها به‌عنوان بیماری‌زاهای مهم بیمارستانی باقی‌مانده‌اند. آن‌ها مسئول بیش از ۸۰ درصد از بیماری‌های چرکی می‌باشند که در بالین بیمار یافت می‌شوند و پس از اشریشیاکلی، دومین علت عفونت‌های بیماران بستری در بیمارستان را به خود اختصاص می‌دهند. از میان ۲۰ گونه استافیلوکوک، فقط ۳ گونه از آن‌ها: استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس اهمیت بالینی دارند (۱).

تایپینگ مولکولی می‌تواند نقش بسزایی را در مطالعات اپیدمیولوژیک عفونت‌های بیمارستانی بازی کند. با آگاهی از این مطلب در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته، ژنوتایپینگ بخش چشمگیری از مطالعات سیستم بهداشت و درمان را به خود اختصاص داده تا از آن‌ها در کنترل عفونت‌ها بهره ببرند (۲). در سال‌های اخیر روش‌های متنوعی از تکنیک‌های مولکولی برای ژنوتایپینگ ارائه شده‌اند همانند الکتروفورز پالسفیلد، الکتروفورز آنزیمی با لوکوس متعدد (MLEE)، تیپ بندی توالی با لوکوس متعدد (MLST)، تیپ بندی با ژن Spa و ژنوتیپ بندی بر پایه کوآگولاز (۲ و ۳). روش الکتروفورز پالسفیلد هرچند کاراترین روش تایپینگ مولکولی می‌باشد ولی تکنیک پیچیده، گران و زمان‌بر است. به همین دلیل تلاش‌هایی در جهت دستیابی به تکنیک‌های ساده، سریع و ارزان انجام پذیرفت. مطالعات مختلف نشان داد تکثیر مناطق ژنی بسیار متغیر و آنالیز هضم آنزیمی محصول (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)، یکی از روش‌های کارا در تایپینگ مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۲ و ۴).

ژن coa که پروتئین کوآگولاز را کد می‌کند به علت داشتن توالی‌های متغیر در ناحیه کد کننده '۳ بسیار پلی مرف است و می‌تواند در متمایز کردن جدایه‌های این باکتری مورد استفاده قرار گیرد. ناحیه متغیر ژن coa از توالی‌های تکراری ۸۱ جفت بازی تشکیل شده است که تعداد تکرار این توالی‌ها در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس متغیر است. در بسیاری از کشورها تعیین ژنوتیپ استافیلوکوکوس اورئوس بخشی از برنامه‌های دستگاه‌های نظارتی بوده و ابزار مهمی در مطالعه خواستگاه سویه‌ها، تعیین ارتباط کلون‌ها و اپیدمیولوژی موارد شیوع است (۵). این روش افزون بر ارائه نتایج آسان، ارزان و مناسب جهت مطالعات اپیدمیولوژیک، قادر به تمایز بین گونه‌های اپیدمیک و اسپورادیک در جنس خاصی از باکتری‌ها می‌باشد (۴).

پژوهش حاضر با هدف دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی بر پایه‌ی ژن کواگولاز در استان چهار محال و بختیاری انجام پذیرفت.

روش کار

تعداد ۲۲۰ نمونه عفونی شامل خلط (۵۲ نمونه)، ادرار (۸۶ نمونه)، چرک (۶۸ نمونه)، خون (۱۴ نمونه) از بیماران بستری در بخش عفونی بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال وبختیاری در یک دوره زمانی ۶ ماهه از دی ماه ۱۳۹۷ تا تیر ماه ۱۳۹۸ جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل گردید.

نمونه‌های ادرار در دور ۱۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و از رسوب حاصله جهت کشت میکروبی استفاده شد اما سایر

نمونه‌ها به طور مستقیم کشت شدند. نمونه‌های اماده شده در محیط غنی کننده TSB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت و پس از غنی سازی صورت خطی در محیط بلاد آگار (مرک، آلمان) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از رشد میکروبی، روی پرگنه‌های رشد کرده رنگ آمیزی گرم و آزمایش کاتالاز انجام و پرگنه‌های همولیتیک که واجد کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای شکل و کاتالاز مثبت بودند به عنوان پرگنه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس* انتخاب و مجدداً در محیط بلاد آگار کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، پرگنه‌های رشد یافته همزمان در دو محیط برد پارکر (مرک، آلمان و مانیتول سالت آگار) (MSA) (مرک، آلمان) کشت و آزمایش کواگولاز روی آن‌ها انجام گرفت. پرگنه‌هایی که توان منعقد کردن پلاسمای سیتراته خرگوش را داشته و در محیط برد پارکر ایجاد پرگنه‌های سیاه رنگ با یک هاله شفاف کرده و قند مانیتول را تخمیر کرده بودند به عنوان پرگنه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* انتخاب و جهت آزمایش‌های بعدی در محیط مایع TSB (مرک، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

جهت تأیید قطعی وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* در پرگنه‌های انتخابی از آزمایش PCR استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA ژنومی ایزوله‌های رشد یافته در محیط TSB به روش جوشاندن (Boiling) استخراج گردید. آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srDNA* معرفی شده توسط Kumar و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت (۶).

F: AAAGGTCTCGGTAGTAACGGGCTA
R: AAATGCTACTACTATAAGCTGCGAT

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱ میلی مول Mgcl2 ، ۱۵۰ میکرومول dNTP Mix (فرمنتاس- لیتوانی)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R(سیناژن-ایران)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاس-لیتوانی) و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه در دستگاه ترموسایکلر (Germany, Flexcycler) تنظیم گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

از سویه استاندارد شماره ATCC 23235 *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان نمونه کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی در این آزمایش استفاده شد.

جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده ازعفونت‌های بیمارستانی از آزمایش PCR جهت ردیابی ژن کواگولاز استفاده شد. در این مرحله ایزوله‌های جدا شده از مرحله قبلی انتخاب و با استفاده از زوج پرایمرهای معرفی شده توسط Javid و همکاران (۲۰۱۸) آزمایش شدند(۷).

COAG3: ATAGAGATGCTGGTACAGG
COAG2: GCTTCCGATTGTTCGATGC

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x،۲ میلی مول Mgcl2 ، ۱۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای COAG2 وCOAG3 ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله انجام گرفت.

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی گراد به

مدت ۱۵ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه. جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده بر پایه ژن coa از هضم آنزیمی محصول coa در حضور آنزیم اندونوکلئاز تعیین حدودی AluI (فرمنتاس لیتوانی) استفاده شد. AluI در نواحی از ژن که دارای توالی AGCT باشد بین بازه‌ای G و C برش ایجاد می‌کند. واکنش هضمی در حجم ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد (۷).

واکنش در دمای ۳۷ درجه بن ماری به مدت ۱۸ساعت انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد واجد محلول رنگی DNA safe stain (سیناژن-ایران) در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی با ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت به مدت ۷۰ دقیقه انجام گرفت. ژل مورد نظر با دستگاه ترانس لومیناتور UV مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

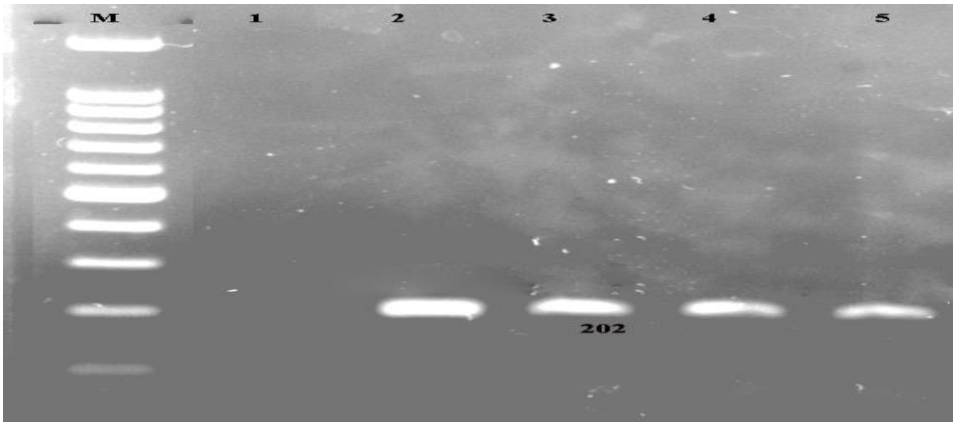
پژوهش حاضر با هدف ردیابی ژن coa در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد که برای این منظور تعداد۲۲۰ نمونه عفونی از انواع عفونت‌های شایع در بیماران بستری شامل نمونه‌های خلط، ادرار، چرک و خون اخذ و به روش کشت میکروبی آزمایش شدند. از جمع ۲۲۰ نمونه مورد مطالعه تعداد ۹۲ نمونه (۴۱/۸۱درصد) آلوده به استافیلوکوکوس ارئوس بودند که توزیع آلودگی در هر گروه در جدول ۱ آورده شده است:

جدول ۱- فراوانی آلودگی به استافیلوکوکوس ارئوس در نمونه‌های بالینی اخذ شده از انواع عفونت‌های بیمارستانی در استان چهارمحال و بختیاری

نوع نمونه عفونی	تعداد نمونه	تعداد و درصد موارد آلوده با استافیلوکوکوس ارئوس
خلط	۵۲	۳۴/٪۶۱
ادرار	۸۶	۳۹/٪۵۳
چرک	۶۸	۵۴/٪۴۱
خون	۱۴	۲۱/٪۴۲
جمع کل	۲۲۰	۴۱/٪۸۱

فراوانی آلودگی با استافیلوکوکوس ارئوس در نمونه‌های اخذ شده از ضایعات چرکی معادل ۵۴/۴۱ درصد و در نمونه‌های اخذ شده از موارد باکتریمی و عفونت‌های خونی معادل ۲۱/۴۲ درصد بود در تجزیه وتحلیل آماری نتایج با مدل آماری مربع کای، اختلاف آماری معنی داری بین میزان آلودگی با استافیلوکوکوس ارئوس در نمونه‌های اخذ شده از چرک با سایر نمونه ها در سطح اطمینان ۹۵درصد ($p=0.032$) مشاهده شد.

جهت تایید قطعی استافیلوکوکوس ارئوس در ایزوله‌های جدا شده با روش کشت میکروبی از آزمایش PCR جهت ردیابی ژن 16srRNA استفاده شد که تمام ایزوله‌های جدا شده در این آزمایش مثبت بودند. ژل حاصل از ردیابی ژن فوق در تعدادی از ایزوله‌های مورد مطالعه در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن 16srDNA در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس (ستون M=مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون 1= نمونه کنترل منفی، ستون‌های 5-2= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۲۰۲ جفت بازی DNA مربوط به ژن 16srDNA).

از ۹۲ ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از انواع عفونت‌های بیمارستانی تعداد ۴۶ ایزوله (۵۰درصد) واجد ژن کد کننده آنزیم کواگولاز (ژن Coa) بودند که در این میان ۱۳ ایزوله Coa^+ متعلق به ایزوله‌های جدا شده از خلط، ۹ ایزوله مربوط به ایزوله‌های جدا شده از ادرار، ۲۱ ایزوله Coa^+ متعلق به ایزوله‌های جدا شده از ضایعات چرکی و ۳ ایزوله متعلق به ایزوله‌های جدا شده از عفونت‌های خونی بودند. آنالیز آماری نتایج حاصله نشانگر وجود اختلاف آماری معنی داری بین فراوانی ایزوله‌هایCoa^+ در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های ادرار با سایر نمونه‌های عفونی بود ($p=0.031$).

بر اساس قطعه باندی تکثیر یافته از تکثیر ژن Coa در ایزوله-های Coa^+ جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی چهار ژنوتیپ ا تا IV از ژن Coa شناخته شد بدین صورت که ۲۹ ایزوله با داشتن قطعه ۵۹۵ جفت بازی در تیپ CoaI، ۹ ایزوله با داشتن قطعه ۸۰۲ جفت بازی در ژنوتیپ coaII، ۳ ایزوله با دارا بودن قطعه ۵۱۴ جفت بازی در ژنوتیپ CoaIII و ۵ ایزوله با داشتن قطعه ۷۵۷ جفت بازی در ژنوتیپ CoaIV قرار گرفتند (شکل ۲). توزیع انواع تیپ‌های Coa در ایزوله‌های جدا شده از انواع نمونه‌ی عفونی در جدول (۲) آورده شده است که همان گونه که مشهود است تیپ CoaI با شیوع ۶۳ /۰۴ درصدی غالب ترین ژنوتیپ شناخته شده ژن Coa در ایزوله‌های Coa^+ استافیلوکوکوس ارئوس بود.

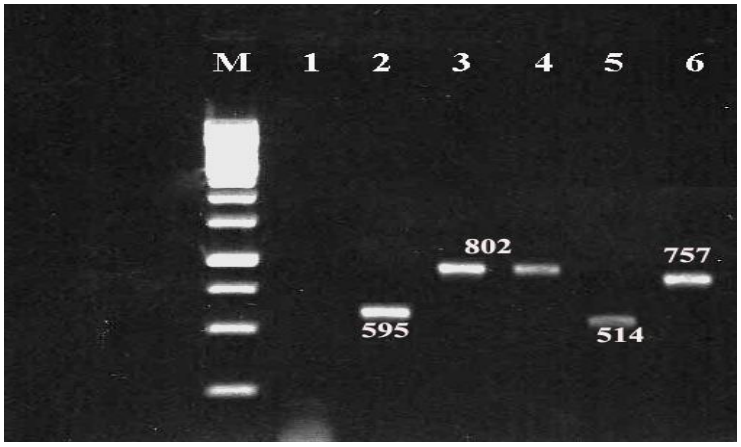
جدول ۱- توزیع تیپ‌های ژن coa در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از انواع عفونت‌های بیمارستانی در استان چهارمحال و بختیاری

نوع نمونه عفونی	تعداد ایزوله Coa^+	ژنوتیپ‌های Coa
خون	۳	CoaI=2 CoII=1
چرک	۲۱	CoaI=13 CoII=5 CoIII=3
ادرار	۹	CoaI=6 CoII=1 Coa IV=2

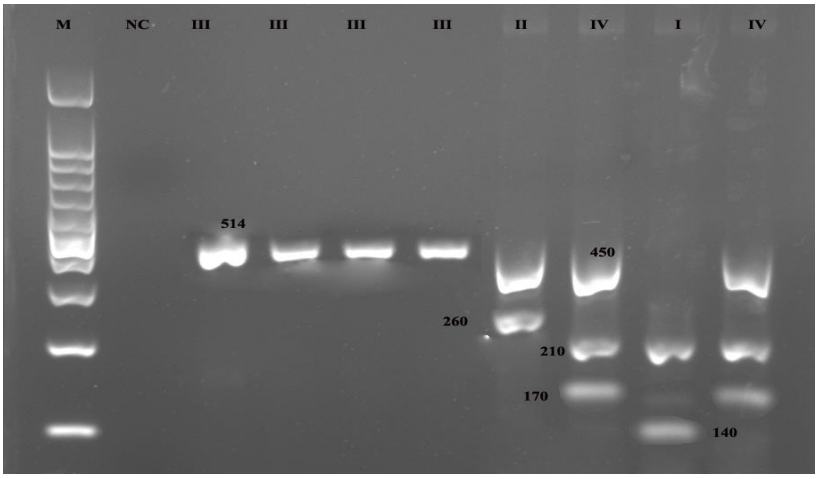
خلط	۱۳	CoaI=8 CoII=2 Coa IV=3

در ایزوله‌های جدا شده ازخلط و ادرار سه ژنوتیپ I،II،IV در ایزوله‌های جدا شده از ضایعات چرکی سه ژنوتیپ I،II،III و در ۳ ایزوله جدا شده از عفونت‌های خونی تنها دو تیپ Iو II شناسایی شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از ژنوتایپینگ ژن Coa در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از انواع عفونت‌های بیمارستانی با مدل آماری دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد نشانگر وجود اختلاف آماری معنی داری بین تیپ CoaI با سایر ژنوتیپ‌ها (p=0.019) و نیز بین تیپ CoaIII با دو تیپ CoaII و CoaIV (p=0.032) بود.

در ایزوله‌های Coa^+ جدا شده از خلط و ادرار اختلاف آماری معنی داری بین فراوانی تیپ I با دو تیپ II و IV (p=0.032)، در ایزوله‌های جدا شده از چرک اختلاف آماری معنی داری بین فراوانی تیپ CoaI با دو تیپ II و III (p=0.029) و در ایزوله-های Coa^+ جدا شده از خون اختلاف آماری معنی داری بین فراوانی دو تیپ I و II (p=0.030) مشاهده شد. در آزمایش RFLP جهت هضم آنزیمی محصول ژن coa در تیپ‌های ۴ گانه شناخته شده در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از انواع عفونت‌های بیمارستانی از آنزیم AluI استفاده شد. درالکتروفورز محصول RFLP تصویر (۳) در ایزوله‌های متعلق به تیپ CoaI سه قطعه ۱۴۰،۱۷۰،۲۱۰ جفت بازی، در ایزوله‌های متعلق به تیپ CoaII دو قطعه ۴۵۰،۲۶۰ جفت بازی و در ایزوله-های مربوط به تیپ CoaIV سه قطعه ۴۵۰،۱۷۰،۲۱۰ جفت بازی مشاهده شد اما در ایزوله‌های متعلق به تیپ CoaIII باندی از هضم آنزیمی یافت نشد.



شکل ۲- ژل حاصل از ردیابی ژن coa در تعدادی از ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از انواع عفونت‌های بیمارستانی در استان چهارمحال و بختیاری



شکل ۳- ژل حاصل از هضم آنزیمی محصول ژن coa در ژنوتیپ‌های مختلف coa با آنزیم AluI

بحث

بررسی توان تولید آنزیم کواگولاز یک ویژگی مهم برای شناسایی استافیلوکوکوس ارئوس بوده و در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. طبقه بندی براساس ژن کواگولاز (coatyping) روش ساده دقیق جهت تیپ بندی مولکولی سویه-های استافیلوکوکوس ارئوس محسوب می‌شود طوری که Raimundo و همکاران گزارش کرده‌اند که این روش می‌تواند در تحقیقات اپیدمیولوژیک جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس به دلیل تکرار پذیری بالا و قدرت تفکیک و افتراق مناسب، مورد استفاده قرار گیرد (۸).

پژوهش حاضر با هدف تعیین فراوانی آلودگی با استافیلوکوکوس ارئوس در نمونه‌های عفونی اخذ شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری و ژنوتایپینگ ایزوله‌های جدا شده بر پایه ژن مولد کواگولاز (coa) انجام شد. از جمع ۲۲۰ نمونه اخذ شده از انواع عفونت‌های شایع بیمارستانی تعداد ۹۲ نمونه (۸۱/ ۴۱درصد) آلوده به استافیلوکوکوس ارئوس بودند که در این میان نمونه-های اخذ شده از ضایعات چرکی در پوست و بافت نرم (انواع آبسه‌ها وزخم‌های ناشی از جراحی) با ۵۴/۴۱ درصد فراوانی بیشترین میزان آلودگی با استافیلوکوکوس ارئوس را به خود اختصاص دادند. این یافته با نتیجه مطالعات قبلی از جمله مطالعه Momtaz و Hafezi (۲۰۱۴) همراستا است. در مطالعه اخیر از ۱۳۲ نمونه عفونی اخذ شده از انواع عفونت‌های بیمارستانی در بیمارستان‌های ایران، شیوع آلودگی با استافیلوکوکوس ارئوس معادل ۵۰ درصد بر آورد گردید که ۶۶/۱۲ درصد از نمونه‌های اخذ شده از زخم‌های چرکی آلوده به استافیلوکوکوس ارئوس بودند (۹).

از جمع ۹۲ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از عفونت-های بیمارستانی در مطالعه حاضر ۴۶ ایزوله واجد ژن Coa بودند که بر پایه قطعه ژنی تکثیر یافته در آزمایش PCR و برش آنزیمی قطعه تکثیر یافته با آنزیم AluI، چهار تیپ Coa در این ایزوله‌ها یافت شد که به ترتیب تیپ I با فراوانی ۶۳/۰۴ درصد، تیپ II با شیوع ۱۹/۵۶ درصد، تیپ IV با فراوانی ۱۰/۸۶ درصد و تیپ III با شیوع ۶/۵۲ درصد ژنوتیپ‌های شناخته شده ژن Coa در این ایزوله ها بودند. در ایزوله های جدا شده از نمونه های خلط و ادرارسه ژنوتیپ I،II،IV در ایزوله های جدا شده از ضایعات چرکی سه زنوتیپ I،II،III ودر سه ایزوله جدا شده از عفونت خون تنها دو ژنوتیپ I،II یافت شد ودر ایزوله های متعلق به هر نمونه عفونی اختلاف آماری معنی داری بین ژنوتیپ CoaI با سایر تیپ های Coa مشاهده شد.

در بررسی پلی مرفیسم ژن Coa روی ۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از عفونت های تنفسی در مطالعه رئیسی و همکاران ، ۳ ژنوتیپ I (۷۰درصدفراوانی)، VIII (۲۶/۶۶ درصد فراوانی) و IX (۳/۳درصد شیوع) گزارش گردید (۱۰).

در مطالعه Karahan و همکاران (۲۰۰۷) در ترکیه از مجموع ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده، ۱۶۱ ایزوله (۸۰/۵درصد) دارای پلی مورفیسم در ژن Coa بودند که بعد از برش آنزیمی محصول PCR با آنزیم AluI، ۲۳ الگوی متفاوت در ایزوله ها یافت شد که ژنوتیپ XIV با فراوانی ۳۴/۲ درصد غالب ترین تیپ شناخته شده در این مطالعه بود (۱۱).

در مطالعه حاضر از آنزیم AluI، جهت RFLP محصول Coa استفاده شد و اگرچه ۳ الگوی مختلف برشی در ژنوتیپ های I،II،IV بدست آمد ولی هر کدام از این الگو های باندی متعلق به یک اندازه محصول از ژن Coa (قطعات ۷۵۷،۸۰۲،۵۹۵ جفت بازی) بوده و عملا این آنزیم نتوانسته تفاوت و تنوع داخلی در سایز باندهای مختلف ژن Coa را نشان داد این یافته در مطالعات قبلی از جمله مطالعه شایق و منادی و مطالعه Stutzenbager & SanClemente (۱۹۶۷) گزارش شده است (۱۲ و ۱۳).

در بعضی از مطالعات از آنزیم HaeIII برای تعیین پلی مورفیسم ژن Coa استفاده شده است. در مطالعه Talebi و همکاران با برش آنزیمی محصول PCR ژن Coa با آنزیم HaeIII روی ۲۶ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از ادرار و پوست ، ژنوتیپ های C_1 تا C_6 گزارش شد که ژنوتیپ C_1 با فراوانی ۶۹/۲ در صد بیشترین شیوع را داشت (۱۴). در این مطالعه همانند مطالعه حاضر ژنوتیپ I غالب ترین ژنوتیپ Coa در ایزوله های جدا شده از انواع عفونت های بالینی بود که نشانگر قدرت بیماری زایی و پایداری بیشتر این ژنوتیپ در اتصال و موضعی شدن در سطوح مختلف پوستی و مخاطی است.

Montesinos و همکاران با مطالعه بر روی ۱۲۴ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از عفونت های بالینی در بیمارستان جزایر قناری در فاصله سال های ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۰ و استفاده از روش PCR-RFLP ژن کواگولاز، چهار ژنوتیپ Coa را گزارش کردند که تیپ CoaI با فراوانی ۸۹ درصد به عنوان شایع ترین تیپ در ایجاد اپیدمی های ناشی از استافیلوکوکوس ارئوس معرفی شد (۱۵).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر و مقایسه آن با گزارشات مشابه از دیگر محققین، نشان داد که تکنیک PCR-RFLP ژن Coa یک روش سریع و قابل اعتماد در شناسایی و تیپ بندی مولکولی ایزوله-های استافیلوکوکوس ارئوس بوده و شیوع بالای ژنوتیپ CoaI در ایزوله های جدا شده از انواع عفونت‌های بالینی در این مطالعه، نشانگر این است که این تیپ می‌تواند منبع بالقوه‌ای از انتشار استافیلوکوکوس ارئوس در جامعه باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات مدیریت محترم بخش عفونی بیمارستان های مورد مطاله و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جناب آقای مهندس سهراب صفری تشکر و قدردانی می‌کنند. مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می باشد.

تعارض در منافع

در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

References

1. Effendi MH, Hisyam MAM, Hastutiek P, Tyasningsih W. Detection of coagulase gene in Staphylococcus aureus from several dairy farms in East Java, Indonesia, by polymerase chain reaction. Vet World 2019;12(1):68-71.
2. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al; Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillinresistant Staphylococcus aureus (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005;56(6):1000-18.
3. Gemmell CG, Edwards DI, Fraise AP, Gould FK, Ridgway GL, Warren RE; Joint Working Party of the British Society for Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Hospital Infection Society and Infection Control Nurses Association. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections in the UK. J Antimicrob Chemother 2006;57(4):589-608.
4. Duckworth GJ, Lothian JL, Williams JD. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: report of an outbreak in a London teaching hospital. J Hosp Infect 1988;11(1):1-15.
5. Himabindu M, Muthamilselvan DS, Bishi DK, Verma RS. Molecular analysis of coagulase gene polymorphism in clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus by restriction fragment length polymorphism based genotyping. Am J Infect Dis 2009:5;170-6.
6. Kumar R, Yadav BR, Singh RS. Genetic determinants of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus isolates from milk of mastitic crossbred cattle. Current microbiology. 2010 May 1;60(5):379-86.
7. Javid F, Taku A, Bhat MA, Badroo GA, Mudasir M, Sofi TA. Molecular typing of Staphylococcus aureus based on coagulase gene. Vet world. 2018 Apr;11(4):423.
8. Raimundo O, Deighton M, Capstick J, Gerraty N. Molecular typing of Staphylococcus aureus of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. Vet Microbiol. 1999; 66(4): 275-284
9. Momtaz H, Hafezi L. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from Iranian hospitals: virulence factors and antibiotic resistance properties. Bosn J Basic Med Sci. 2014 Nov;14(4):219.
10. Reisi M, Tajbakhsh E, Momtaz H. Coagulase gene polymorphism of Staphylococcus aureus isolated from clinical respiratory system infections in Shahrekord. J Microb World. 2014;7(3):206-13
11. Karahan M, Cetinkaya B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. Vet J. 2007; 174(2): 428-431.
12. Shayegh J, Monadi AR. Polymorphism of coagulase gene in Staphylococcus aureus isolated from buffaloe milk. Food Hygiene. 2013;1(9):25-31.
13. Stutzenberger FJ, San Clemente CL. Nephelometric assay of bovine antistaphylocoagulase serum. J Bacteriol. 1967 Oct 1;94(4):821-5.
14. Talebi-Satlou R, Ahmadi M, Saei HD. Restriction fragment length polymorphism genotyping of human Staphylococcus aureus isolates from two hospitals in Urmia region of Iran using the coa gene. Jundishapur J Microbiol. 2012; 5(2): 416-420
15. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol. 2002; 40(6): 2119-2125.

Original Article

Genotyping of Staphylococcus aureus strains isolated from nosocomial infections in Chaharmahal and Bakhtiari province based on coa gene

Received: 14/07/2020 - Accepted: 23/01/2020

Zahra Asgari [1]
Hassan Momtaz [2*]

[1] Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, , Shahrekord, Iran
[2] Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email: hamomtaz@yahoo.com

Abstract

Introduction: Various methods, such as genotyping based on coa gene and PCR-based methods, have been used to genetically classify Staphylococcus aureus. In the present study, coa gene tracking was used for genotyping of Staphylococcus aureus strains.

Methods: 220 infectious samples including sputum (52 samples), urine (86 samples), pus (68 samples), blood (14 samples) from patients admitted to the infectious ward of hospitals in Chaharmahal and Bakhtiari province in a period of 6 months It was collected from January 2016 to July 2017 and transferred to the Microbiology Research Center of Shahrekord Azad University.

Results: Of the 220 clinical samples obtained from the most common nosocomial infections in hospitalized patients in Chaharmahal and Bakhtiari province, 92 samples (41.81%) were infected with Staphylococcus aureus and were traced in 46 isolates of coagulase encoding gene. Based on a multiplied band of coa gene proliferation isolated in coa+ isolates, four I to IV genotypes were identified from the coa gene, with 29 isolates in the coaI type, 9 isolates in the coaII genotype, 3 isolates in the coaIII genotype, and 5 isolates in the coaIV genotype. In the RFLP test using the AluI enzyme, in the coaI type isolates, there were three 140,170,210 bp fragments, in the coaII type isolates, two 450 and 260 bp fragments, and in the coaIV type isolates, three 450,170 and 210 bp fragments were observed, but in the isolates belonging to coaIII type, no enzyme digestion was found.

Conclusion: Overall, the PCR-RFLP *coa* gene is a rapid and reliable method for the molecular identification and typing of erectile Staphylococcal isolates, and the high prevalence of coaI genotype in strains isolated from various clinical infections indicates that this type could be a potential source of *Staphylococcus aureus* spread in the community.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, nosocomial infections, genotyping, *coa* gene, Chaharmahal and Bakhtiari province**.**