

بررسی پلی‌مورفیسم ژن *Spa* در ایزوله‌های بالینی و ناقلین نازال استافیلوکوکوس اورئوس

چکیده

حسن محمودی^۱

محمد رضا عربستانی^۱

سید فضل‌الله موسوی^۲

صفیه غافل^۳

محمد یوسف علیخانی^{*۱}

۱- مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه

میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۲- گروه میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۳- گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

* نویسنده مسئول: خیابان شهید فهمیده،

روبه‌روی پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی پزشکی

تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۱۳۰

E-mail: alikhani43@yahoo.com

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و کسب‌شده از جامعه می‌باشد. به دلیل قدرت بیماری‌زایی زیاد و مقاومت در برابر داروهای ضد میکروبی به یکی از مهمترین مشکلات بهداشتی در دنیا تبدیل شده است.^۱ استافیلوکوکوس اورئوس باعث عفونت‌های چرکی متنوع و مسمومیت‌های غذایی در

دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸ آنلاین: ۱۳۹۳/۱۲/۲۰

زمینه و هدف: پروتیین A یک جزو اصلی در دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس است که آنالیز توالی نوکلئوتیدها در ناحیه x ژن *spa* کدکننده پروتیین A نشان داد این ناحیه از ۲۴ جفت باز تکراری تشکیل شده که دارای پلی‌مورفیسم بالایی است. در این مطالعه الگوهای ژن *spa* استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بینی پرسنل و نمونه‌های بالینی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در مجموع ۲۰۰ نمونه بالینی از بیماران بستری و سوپا بینی از کارکنان بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی همدان از مهر ۱۳۹۲ تا مرداد ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. بعد از تایید سویه‌های جدا شده، بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن با توجه به دستورکار Clinical and laboratory standards institute (CLSI) و شناسایی ژن *mecA* سویه‌های *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) و *spa* (کدکننده پروتیین A) با روش PCR انجام شد. محصولات PCR با روش Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) و آنزیم *Rsa I* (*Afa I*) برش خوردند.

یافته‌ها: سویه‌ها MRSA به ترتیب بیشترین حساسیت و مقاومت را به کلیندامایسین و سیپروفلوکساسین داشتند. در مجموع هشت محصول PCR، با اندازه‌های مختلف برای ژن *spa* شناسایی شد که پس از برش آنزیمی ۹ الگو به دست آمد که برخی از این الگوها در ایزوله‌های جدا شده از بینی پرسنل و نمونه‌های بالینی مشترک بودند.

نتیجه‌گیری: الگوهای مشابه ژن *spa* در بیماران بستری و کارکنان بیانگر این مطلب است که یک منبع عفونت مشترک در چرخش و انتقال از فرد به فرد در بیمارستان است. تجزیه و تحلیل این الگوها می‌تواند انتقال عفونت در میان کارکنان و بیماران بستری در بیمارستان‌ها را کاهش داد و همچنین در درمان‌های دارویی می‌تواند به پزشکان و بیماران کمک کند.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن *spa*، تست آنتی‌بیوگرام دیسک دیفیوژن، واکنش زنجیره پلی‌مراز، مقاومت دارویی، مطالعات وابسته به ژنتیک، پلی‌مورفیسم.

انسان می‌شود.^۲ این باکتری یکی از علل عمده عفونت زخم‌های جراحی در بیماران بستری در بیمارستان و عفونت‌های مرتبط با تجهیزات پزشکی می‌باشد.^۳

استافیلوکوکوس اورئوس به‌طور غالب در سطح پوست و مخاط کلونیزه می‌شود و همچنین می‌تواند در همه بافت‌های بدن زنده بماند، این دسته از میکروارگانیسم‌ها مسئول عفونت‌های گوناگونی در انسان است.^۴ با توجه به اینکه تعداد زیادی از بیماران بستری و

روش بررسی

در مجموع ۲۰۰ نمونه (۱۵۰ نمونه از بیماران بستری و ۵۰ نمونه سواب بینی کارکنان) از بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی همدان جمع‌آوری گردید.

این مطالعه به صورت مقطعی (Cross-sectional) از مهر ۱۳۹۲ تا مرداد ۱۳۹۳ انجام شد. این مطالعه گونه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی شامل تست کاتالاز، کوآگولاز با استفاده از سرم سیتراته خرگوش (Liofilchem S.R.L., Roseto Degli Abruzzi, Italy) و تخمیر مانیтол روی محیط مانیтол سالت آگار (MAS) و آزمایش DNase تایید گردید. حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومايسين (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، تری‌متوپریم سولفامتاکسازول (۲۵ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، اریترومايسين (۱۵ µg)، کلیندامایسین (۲ µg)، ریفاپمپین (۵ µg) و سفوکستین (۱۵ µg) با روش دیسک دیفیوژن آگار (MAST Laboratories Ltd., Bootle, Merseyside, UK) Clinical and laboratory standards institute (CLSI) تعیین شد.^{۱۶}

ژنوم سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از کشت‌های ۲۴ ساعته باکتری و بر اساس دستورکار شرکت سازنده کیت (Bioflux, Japan) استخراج گردید. سپس DNA استخراج شده در فریزر °C ۲۰- ذخیره گردید. برای شناسایی ژن‌های *spa* و *mecA* DNA ۲ µl استخراج شده به ۱۸ µl از مخلوط واکنش PCR اضافه گردید. به منظور تکثیر ژن *spa* و *mecA* از پرایمرهای زیر استفاده شد.^{۱۷، ۱۸}

mecA1: (R) GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA

mecA2: (F) CCAATTCACATTGTTTCGGTCTAA

Spa1: (R) ATCTGGTGGCGTAACACCTG

Spa2: (F) CGCTGCACCTAACGCTAATG

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ µl برای تکثیر ژن *spa* و *mecA* به ترتیب به روش زیر انجام شد. دناتوراسیون اولیه در دمای °C ۹۴ به مدت پنج دقیقه و ۳۰ سیکل شامل: ۱- دمای °C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه (Denaturation)، ۲- دمای °C ۶۰ به مدت ۴۵ ثانیه (Annealing) و ۳- دمای °C ۷۲ به مدت ۴۵ ثانیه (Extension)، دمای °C ۷۲ به مدت پنج دقیقه (Final extension) همچنین برای ژن *spa* دناتوراسیون اولیه در دمای °C ۹۴ به مدت سه دقیقه و ۳۰ سیکل

پرسنل ناقل سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از جمله مقاوم به متی‌سیلین بوده و در بینی یا پوست خود داری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند، انتشار این باکتری به واسطه تماس با ناقلین آن در بیمارستان‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.^{۶، ۹} در سه دهه گذشته، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) به عنوان یکی از پاتوژن‌های اصلی در بیمارستان‌ها و همچنین عفونت‌های کسب‌شده از جامعه شناخته شده است.^{۷-۹} با وجود پیشرفت تکنولوژی و درمان دارویی، عفونت‌های ایجاد شده به وسیله گونه‌های MRSA هنوز به عنوان یک عامل پاتوژن سخت به شمار می‌آید.^{۱۰}

نخستین گونه‌های MRSA در سال ۱۹۶۱ ایزوله شده‌اند.^{۱۱، ۱۲} پس از مدتی، استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین به طور گسترده به عنوان عامل مهم مرگ‌ومیر در جهان شناسایی شدند. در حدود ۳۵٪ عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس توسط این سویه‌ها ایجاد می‌شود.^۸ افزایش مقاومت استافیلوکوک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام به یک مشکل کلینیکی اصلی تبدیل شده است.^{۱۳، ۱۴} پروتیین A یک جزء اصلی در دیواره‌ی سلولی استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. آنالیز توالی نوکلئوتیدها در ناحیه x ژن کدکننده *spa* پروتیین A استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده شده است که این ناحیه از ۲۴ جفت باز تکراری تشکیل شده است. این ناحیه دارای پلی‌مورفیسم بالایی می‌باشد که تعداد و توالی منحصر به فرد تکراری در میان گونه‌های متفاوت می‌باشد. ناحیه اتصالی به FC ایمونوگلوبولین‌ها ناحیه x نامیده می‌شود که از بررسی این ناحیه تفاوت بین سویه‌های اپیدمیک و غیراپیدمیک مشخص می‌گردد.^{۱۴، ۱۵}

تایپینگ (Typing) سریع و دقیق استافیلوکوکوس اورئوس به منظور شناسایی انتقال این ارگانیزم عفونت‌زا بسیار حایز اهمیت می‌باشد. با تایپینگ مولکولی این پروتیین می‌توان موجب کوتاه نمودن و یا جلوگیری از بروز اپیدمی‌ها و کاهش تعداد عفونت‌ها و همین‌طور کاهش هزینه ناشی از عفونت‌های بیمارستانی گردید.^{۱۵} تکثیر ژن *spa* (کدکننده آنزیم پروتیین A) روشی ساده و دقیق برای تایپینگ استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله‌شده از منابع بالینی است. هدف از این مطالعه بررسی الگوهای ژنی *spa* (پروتیین A) استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بینی پرسنل و نمونه‌های بالینی از بیماران بستری در بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی همدان بود.

اورئوس با روش کربی‌بایر نتایج به این صورت که در بین سویه‌های MRSA بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک کلیندامایسین (۲ µg) و بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۵ µg) مشاهده گردید (جدول ۱).

همچنین میزان شیوع ژن *mecA* در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده ۵۰٪ بود. در بررسی ژن *spa* در بیماران و ناقلین مورد مطالعه، هشت محصول PCR به دست آمد (شکل ۱) که بیشترین فراوانی مربوط به تیپ A_۱ (۱۱۵۰-۱۲۰۰ جفت باز) با فراوانی (۴۴/۵)٪، ۸۹ و پس از آن A_۲ (۱۲۵۰-۱۳۰۰ جفت باز) با فراوانی (۴۰/۵)٪، A_۳ (۱۳۵۰-۱۴۰۰ جفت باز)، A_۴ (۱۴۵۰-۱۵۰۰ جفت باز)، به ترتیب با ۱۴ (۷)٪ و شش (۳)٪ قرار داشتند در میان سویه‌ها تعداد سه سویه بدون باند و هفت سویه با دو باند محصول PCR مشاهده شدند (جدول ۲). پس از برش با آنزیم‌های محدودکننده ۹ الگوی Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) در میان سویه‌های MRSA و ناقلین حاصل شد (شکل ۲) که (۶۰)٪ از این الگوها در میان سویه‌های MRSA و MSSA مشترک بودند. سه قطعه (۱۰۰۰، ۲۱۰، ۹۰۰ جفت بازی) بیشترین فراوانی را در میان نمونه داشتند (جدول ۳).

در میان ایزوله‌های MRSA و MSSA کلینیکال الگوی RFLP حاصل A_۴ (۱۴۵۰-۱۵۰۰ جفت باز) یک تیپ منحصر به فرد در بیماران بستری بود که در سویه‌های جدا شده از ناقلین مشاهده نشد.

شامل: ۱- دمای °C ۹۴ به مدت یک دقیقه (Denaturation)، ۲- دمای °C ۵۵ به مدت یک دقیقه (Annealing)، ۳- دمای °C ۷۲ به مدت ۹۰ ثانیه (Extension)، دمای °C ۷۲ به مدت پنج دقیقه (Final extension) اعمال شد.

الکتروفورز محصولات PCR در ژل ۱/۵٪ به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۱۰ ولت صورت گرفت. پس از اتمام الکتروفورز نتایج توسط UV transilluminator (Cleaver Scientific Ltd., Warwickshire, UK) مشاهده شد.

از مارکر bp ۱۰۰ (SinaClon BioScience Co., Tehran, Iran) برای تایید وزن مولکولی محصولات PCR استفاده گردید. به منظور انجام هضم آنزیمی در داخل یک میکروتیوپ استریل ۱ µl از محصولات PCR به همراه ۱ µl آنزیم محدودکننده *Rsa I* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) اضافه گردید، سپس ۲ µl بافر آنزیم ۱۰ x اضافه کرده و در نهایت ۱۶ µl آب مقطر استریل اضافه شد تا حجم نهایی به ۲۰ µl برسد، سپس میکروتیوپ‌های حاوی مواد گفته شده به مدت یک شب در °C ۳۷ انکوبه گردیدند. پس از این مدت میکروتیوپ‌ها برای غیرفعال شدن آنزیم به مدت ۲۰ دقیقه در °C ۵۰ انکوبه شدند.

در مرحله بعد محصولات هضم آنزیمی به مدت دو ساعت در ژل آگار ۲٪ در ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردیدند. از Chi-square test (SPSS software, version 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها

از مجموع ۲۰۰ نمونه مورد مطالعه، ۹۹ نفر مرد (۴۹/۵)٪ و ۱۰۱ نفر زن (۵۰/۵)٪ بودند. بیشترین نمونه‌های به دست آمده به ترتیب خون، تراشه، ادرار، زخم، مایعات بدن، آبسه و دستگاه تنفسی بود. از بین این نمونه‌ها ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)، ۱۰۰ نمونه حساس به متی‌سیلین (*Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*, MSSA) که ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین از بینی ناقلین جدا گردید.

پس از بررسی حساسیت ضد میکروبی سویه‌های استافیلوکوکوس

جدول ۱: توزیع فراوانی الگوی مقاومت و حساسیت سویه‌های MRSA

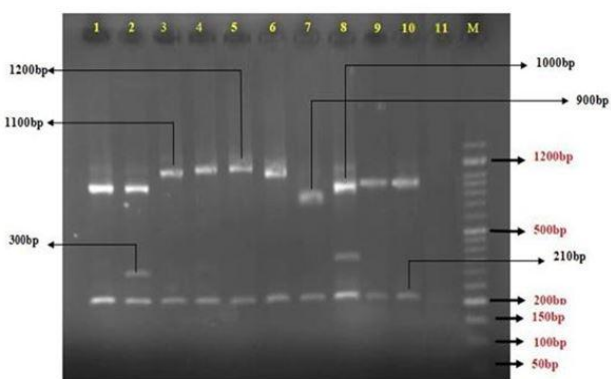
دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی	حساسیت تعداد (%)	مقاومت تعداد (%)
سفوکستین (۱۵ µg)	۰	۱۰۰ (٪۵۰)
ونکومایسین (۳۰ µg)	۱۰۰ (٪۱۰۰)	۰
ریفامپاسین (۵ µg)	۱۵ (٪۱۵)	۸۵ (٪۸۵)
جتامایسین (۱۰ µg)	۱۰ (٪۱۰)	۹۰ (٪۹۰)
تتراسایکلین (۳۰ µg)	۹ (٪۹)	۹۱ (٪۹۱)
کوتریموکسازول (۲۵ µg)	۱۵ (٪۱۵)	۸۵ (٪۸۵)
سیپروفلوکساسین (۵ µg)	۵ (٪۵)	۹۵ (٪۹۵)
کلیندامایسین (۲ µg)	۲۰ (٪۲۰)	۸۰ (٪۸۰)
اریترومایسین (۱۵ µg)	۸ (٪۸)	۹۲ (٪۹۲)

* *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

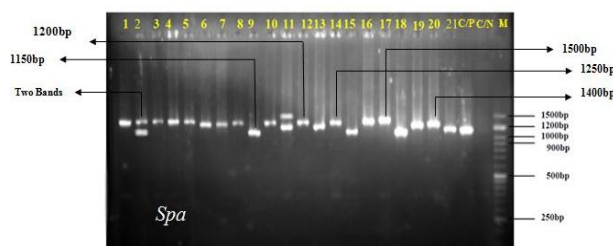
جدول ۲: نتایج PCR در ژن *spa* سویه‌های *s.aureus* جدا شده از نمونه‌های بالینی و ناقلین

مجموع تعداد (%)	سویه MSSA *** بالینی تعداد (%)	سویه ناقلین تعداد (%)	سویه MRSA ** تعداد (%)	محصول PCR *
۳(۱/۵)	-	۱(۲)	۲(۲)	بدون باند
۷(۳/۵)	۲(۴)	-	۵(۵)	جفت باند
۸۹(۴۴/۵)	۲۴(۴۸)	۵(۱۰)	۶۰(۶۰)	۱۱۵۰-۱۲۰۰ bp
۸۱(۴۰/۵)	۱۶(۳۲)	۴۱(۷۰)	۲۴(۲۴)	۱۲۰۰-۱۳۰۰ bp
۱۴(۷)	۶(۱۲)	۲(۴)	۶(۶)	۱۳۵۰-۱۴۰۰ bp
۶(۳)	۲(۴)	۱(۲)	۳(۳)	۱۴۰۰-۱۵۰۰ bp
۲۰۰(۱۰۰)	۵۰(۵۰)	۵۰(۵۰)	۱۰۰(۱۰۰)	مجموع

* Polymerase chain reaction ** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *** Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*



شکل ۲: نتایج الکتروفورز PCR-RFLP محصولات ژن *spa* در برش با آنزیم *RsaI*. ردیف شماره ۱ (الگوی محصول ۱۱۵۰-۱۲۰۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۲ (الگوی محصول ۱۳۵۰-۱۴۰۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۳ و ۴ (الگوی محصول ۱۲۵۰-۱۳۰۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۵ و ۶ (الگوی محصول ۱۴۵۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۷ (الگوی محصول ۱۱۵۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۸ (الگوی محصول ۱۵۰۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۹ و ۱۰ (سویه کنترل مثبت ATCC25923)، ردیف شماره ۱۱ (کنترل منفی)، M (مارکر برای DNA Ladder)



شکل ۱: الکتروفورز محصول ژن *Spa* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین.

ردیف‌های شماره ۱ و ۳ و ۵ و ۱۰ و ۱۱ و ۱۳ (محصول PCR ۱۲۰۰ جفت بازی)، ردیف‌های ۲ و ۱۱ (محصول PCR دو بانده)، ردیف شماره ۹ (محصول PCR ۱۱۵۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۱۷ و ۱۶ (محصول PCR ۱۵۰۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۱۹ و ۲۰ (محصول PCR ۱۴۰۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۶ و ۷ و ۲۱ (محصول PCR ۱۲۰۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۱۵ و ۱۸ (محصول PCR ۱۱۵۰ جفت بازی)، C/P (Control positive سویه ATCC 25923)، C/N (Control negative) M سایز مارکر DNA

همچنین A_2 (۱۲۵۰-۱۳۰۰ جفت بازی) بیشترین مقدار را در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ناقلین داشت که این تیپ در میان سویه‌های کلینیکال به تعداد کمتری وجود داشت. در برخی از سویه‌ها پس از برش آنزیمی به جهت اینکه در اثر آنزیم قطعات کوچکتری حاصل می‌شدند در الکتروفورز بانده مشاهده نشد. الگوهای برشی مشابهی در برخی سویه‌های جدا شده به دست آمد و در برخی سویه‌های جدا شده الگوهای برشی متفاوت مشاهده گردید. Chi-square test رابطه معناداری میان الگوهای به دست آمده از ژن

ژنتیکی مختلفی هستند.^{۲۰} مطالعه Mooldely و همکاران که بر روی ۳۲۰ ایزوله بالینی به بررسی ژن *spa* پرداختند پنج محصول PCR برای این ژن را گزارش کردند که پس از انجام PCR-RFLP الگوهای متفاوتی را نشان دادند.^{۲۱}

در ایران نیز مطالعات زیادی در زمینه تایپینگ سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده است که در این راستا پژوهش‌هایی مانند مطالعه Afrough و همکاران، تعداد ۹ الگوی مختلف از ژن *spa* را نشان داد که این الگوها شامل (۶۵۰bp-۸۰۰bp-۹۰۰bp-۱۲۰۰bp-۱۴۰۰bp) که با محصولات PCR به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر متشابه بود و این نشان از بودن سویه‌های باکتری متشابه از نظر ژنتیکی در مناطق و یا حتی در کشورها دارد.^{۱۵} همچنین مطالعه Emaneini و همکاران، ۲۱ الگوی مختلف از *spa* را گزارش کردند که در میان این محصولات PCR دو الگوی جدید در *spa* تایپینگ را به ثبت رسانند.^{۲۲}

مطالعه الگوهای ژنی *spa* در بیماران و پرسنل به‌منظور شناسایی منشای عفونت در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی همدان تفاوت معناداری را نشان نداد. در بعضی موارد نیز شباهت‌هایی در بخش‌های مختلف مشاهده گردید که به‌احتمال از نوعی انتقال باکتری بین پرسنل و بیماران بوده است. الگوهای A₁ (۱۲۰۰-۱۱۵۰ جفت باز) و A₂ (۱۳۰۰-۱۲۵۰ جفت باز) بیشترین اشتراک را در بین بیمارستان‌های مورد مطالعه داشتند و این می‌تواند ناشی از زنجیره انتقال سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بین پرسنل که اکثر در نمونه‌های گرفته از ناقلین دانشجویان پزشکی و پرستاری بودند که به‌صورت دوره‌ای در بیمارستان‌های دانشگاه دوره کارآموزی را می‌گذرانند، باشند که برای دستیابی به داده‌های دقیق‌تر، مطالعات وسیع‌تر با حجم نمونه‌های گسترده پیشنهاد می‌گردد.

با داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه و مشخص شدن سویه‌ها و تیپ‌های استافیلوکوکوس اورئوس که در بیمارستان‌های همدان در ناقلین و بیماران بستری شده در حال انتقال هستند، با توجه به نتایج تایپینگ کواگولاز و پروتیین A که نشان دادند کدام یک از گونه‌ها در بیماران و کارکنان بیمارستان به‌صورت غالب وجود دارند، می‌توان با در اختیار قرار دادن داده‌های ژنتیکی این سویه‌ها در دسترس پژوهشگران، آنها را از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کنترل شیوع و جلوگیری از عفونت‌های بیمارستانی بررسی نمود و یک مدل درمانی مفید و هدف‌دار را طراحی کرد و در اختیار پزشکان قرار داد.

جدول ۳: نتایج PCR-RFLP محصولات ژن *spa* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

محصول PCR	الگوهای PCR-RFLP *	تعداد (%)
۱۱۵۰-۱۲۰۰ bp	۹۰۰-۲۱۰ bp **	۸۹(۴۴/۵)
۱۲۵۰-۱۳۰۰ bp	۱۱۰۰-۲۱۰ bp	۸۱(۴۰/۵)
۱۳۵۰-۱۴۰۰ bp	۱۰۰۰-۳۰۰-۲۱۰ bp	۱۴(۷)
۱۴۵۰-۱۵۰۰ bp	۱۲۰۰-۳۰۰ bp	۶(۳)
مجموع	-	۱۹۰(۹۰)

* Restriction fragment length polymorphism ** Base pair

بحث

تیپ غالب در همدان دارای الگوی A₁ (۱۱۵۰-۱۲۰۰ جفت باز) بود. همچنین با استفاده از آزمون‌های آماری و محاسبات انجام‌شده اختلاف معناداری میان سویه‌های HM-MRSA و سویه‌های MSSA ناقلین و کلینیکال تیپ A₁ (۱۱۵۰-۱۲۰۰ جفت باز) مشاهده گردید. علاوه بر این سویه‌ها دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری نسبت به بقیه تیپ‌ها بودند. همچنین این سویه‌ها حساسیت بالایی به کلیندامایسین و بالاترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و اریترومیسین داشتند.

در میان سویه‌های ناقلین نیز تیپ A₂ (۱۳۰۰-۱۲۵۰ جفت باز) که بیشترین شیوع را در میان کارکنان بیمارستان‌های مورد مطالعه داشت از نظر الگوی آنتی‌بیوتیکی به سویه‌های HM-MRSA شباهت زیادی داشتند که این گونه می‌تواند در اثر جهش‌های ژنتیکی به یک سویه مقاوم به متی‌سیلین تبدیل شود. در مطالعه Sadia Afroz و همکاران که بر روی ۴۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جمع‌آوری شده، از بیماران با عفونت زخم و ناقلین (کارکنان در بیمارستان) انجام شد. در گونه *Spa* (پروتیین A)، هفت نوع محصول PCR از ژن *Spa* شناسایی کردند که برخی از گونه‌های این مطالعه از نظر الگوهای به‌دست‌آمده با مطالعه حاضر شبیه بودند.^{۱۹}

در مطالعه دیگری ۱۹۱ سویه MRSA جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان که توسط Harmsen مورد بررسی قرار گرفت ۱۰ الگوی مختلف از *spa* گزارش شد که با مطالعه ما وجه اشتراکی نداشتند و این بیانگر این مطلب می‌باشد که سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس عامل عفونت‌های بیمارستانی در مناطق مختلف دارای نقشه

بستری و پرسنل بیمارستان‌ها صورت گیرد.
 سیاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه با عنوان "شناسایی ژن‌های کدکننده آنزیم کواگولاز و پروتیین A در سویه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین ایزوله‌شده از نمونه‌های بالینی و ناقلین" با کد مصوبه ۱۵۱۲ و سال ۱۳۹۲ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد.

با توجه به شیوع عفونت‌های ناشی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اهمیت بررسی ویژگی‌های ژنوتیپی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در ردیابی منشای عفونت و کنترل آلودگی ناشی از آن، پیشنهاد می‌شود مطالعات وسیع‌تری براساس روش‌های مولکولی در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه‌های بیماران

References

- Sahm DF, Critchley IA, Kelly LJ, Karlowsky JA, Mayfield DC, Thomsberry C, et al. Evaluation of current activities of fluoroquinolones against gram-negative bacilli using centralized in vitro testing and electronic surveillance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(1):267-74.
- Tiwari HK, Sapkota D, Gaur A, Mathuria JP, Singh A, Sen MR. Molecular typing of clinical *Staphylococcus aureus* isolates from northern India using coagulase gene PCR-RFLP. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008;39(3):467-73.
- Wisal ME, Hamid MA, Hadia EA, Jalii IM, Ali AS. Coagulase gene polymorphism of *staphylococcus aureus* strains isolated from human, animals and environment. *Pak J Biol Sci* 2005;8(2):278-80.
- Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(3):521-40.
- Anwar MS, Jaffery G, Rehman Bhatti KU, Tayyib M, Bokhari SR. *Staphylococcus aureus* and MRSA nasal carriage in general population. *J Coll Physicians Surg Pak* 2004;14(11):661-4.
- Edoh V, Gadou D, Tia H, Gnonsahe D. Epidemiology and prevention of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients and staff at the Cococry Hemodialysis Center in Abidjan, Ivory Coast. *Med Trop (Mars)* 2003;63(6):590-2.
- Geha DJ, Uhl JR, Gustafiero CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1768-72.
- Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(11):2864-7.
- Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39(4):273-82.
- Glasner C, Sabat AJ, Dreisbach A, Larsen AR, Friedrich AW, Skov RL, et al. Rapid and high-resolution distinction of community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates with identical pulsed-field gel electrophoresis patterns and spa types. *Int J Med Microbiol* 2013;303(2):70-5.
- Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):1083-9.
- Lacey RW, Barr KW, Barr VE, Inglis TJ. Properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonizing patients in a burns unit. *J Hosp Infect* 1986;7(2):137-48.
- Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, et al. Discrimination of epidemic and non-epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994;32(3):846-7.
- Tang YW, Waddington MG, Smith DH, Manahan JM, Kohner PC, Highsmith LM, et al. Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38(4):1347-51.
- Afrough P, Pourmand M, Zeinalinia N, Yousefi M, Abdossamadi Z, Bagherzadeh Yazdchi S. Molecular Typing of Clinical and Nasal Carriage Isolates of *Staphylococcus Aureus* by spa Gene Patterns. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012;22(94):28-34.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 21st Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI; 2013, M100-S21.
- Shakeri F, Shojai A, Ghalipour M, Rahimi Alang S, Vaez H, Ghaemi EA. Spa diversity among MRSA and MSSA strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. *Int J Microbiol* 2010;9(5):1-5.
- Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Maino L, Kayser FH, et al. Sequence comparison of mecA genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* 1990;94(1):137-8.
- Afroz S, Bayezid Hossain ABM, Binte Lutfor A, Muazzam N, Schentag JJ, Hayat JM, et al. Coagulase typing and spa typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: Relatedness among patients' and carrier strains. *Bangladesh J Med Microbiol* 2008;02(01):3-7.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5442-8.
- Moodley A, Oosthuysen W, Duse A, Marais E. Molecular characterization of clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates in South Africa. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4608-11.
- Emaneni M, Khoramrooz SS, Taherikalani M, Jabalameli F, Aligholi M. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from children with adenoid hypertrophy: emergence of new spa types t7685 and t7692. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011;75(11):1446-9.

Study of polymorphism *spa* gene (encoding protein A) of *Staphylococcus aureus* in clinical isolates and nasal carriers

Hassan Mahmoudi Ph.D.
Student¹
Mohammad Reza Arabestani
Ph.D.¹
Seyed Fazlullah Mousavi
Ph.D.²
Safiyeh Ghafel M.Sc.³
Mohammad Yousef Alikhani
Ph.D.^{1*}

1- Brucellosis Research Center and
Department of Microbiology,
Hamadan University of Medical
Sciences, Hamadan, Iran.

2- Department of Microbiology,
Pasteur Institute of Iran, Tehran,
Iran.

3- Department of Microbiology,
Hamadan University of Medical
Sciences, Hamadan, Iran.

* Corresponding author: Hamadan University of Medical Sciences, Department of Microbiology, Shahid fahmideh St., Hamadan, Iran.
Tel: +98-81-38380130
E-mail: alikhani43@yahoo.com

Abstract

Received: 16 Dec. 2014 Accepted: 17 Feb. 2015 Available online: 11 Mar. 2015

Background: *Staphylococcus aureus* is the most important cause of nosocomial infections acquired in the community. Protein A is a major component of *Staphylococcus aureus* cell wall. In analysis of the nucleotide sequence Protein A encoding *spa*, locus x consists of 24 base pairs which repeat with high polymorphism. In this study, the *spa* gene of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens were obtained from patients admitted to the hospital and healthy carriers.

Methods: In a cross-sectional study, a total of 200 samples were collected. One hundred fifty samples were obtained from hospitalized patients and 50 samples obtained from staff nasal swabs in Hamadan University Hospitals from October 2013 to August 2014. Disk diffusion antibiotic susceptibility tests performed. The antibiotics studied were Vancomycin (30 µg), Cefoxitin (15 µg) Gentamicin (10 µg), Tetracycline (30 µg), Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Erythromycin (15 µg), Clindamycin (2 µg), Rifampin (5 µg). The tests performed according to the guidelines of clinical and laboratory standards institute (CLSI). It also detect the *mecA* gene of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) and genes *spa* which encodes the protein A by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method with enzyme *Rsa I* (*Afa I*) were prepared.

Results: This methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain (MRSA) had the highest sensitivity and resistance to ciprofloxacin and clindamycin. Totally, 8 amplicon with different sizes for the *spa* gene were identified. A total of 9 patterns polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) were found. Some of these patterns between *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens and nasal carriers were common.

Conclusion: There is a similar pattern of *spa* gene among patients admitted to the hospital and staff, according to our findings. Analysis of the patterns can reduced transmission of infection in both hospital staff and patients. Also it can help the physicians for correct management of infections.

Keywords: disk diffusion antimicrobial tests, drug resistance, genetic association studies, polymerase chain reaction, polymorphism, *spa* gene, *Staphylococcus aureus*.