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

حسن محمودی[۱]
محمدرضا عربستانی[۱]
سید فضل‌الله موسوی[۲]
صفیه غافل[۳]
محمدیوسف 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: همدان، خیابان شهید فهمیده، روبه‌روی پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی پزشکی
تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۱۳۰
E-mail: alikhani43@yahoo.com

## چکیده

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

***زمینه و هدف:*** پروتیین A یک جزو اصلی در دیواره‌ی سلولی استافیلوکوکوس اورئوس است که آنالیز توالی نوکلئوتیدها در ناحیه x ژن *spa* کدکننده پروتیین A نشان داد این ناحیه از ۲٤ 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 سواپ بینی از کارکنان بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی همدان از مهر ۱۳۹۲تا مرداد ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. بعد از تایید سویه‌های جدا شده، بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به‌روش دیسک دیفیوژن با توجه به دستورکار Clinical and laboratory standards institute (CLSI) و شناسایی ژن *mec*A 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 (*Afa I*) *Rsa I* برش خوردند.

***یافته‌ها:*** سویه‌ها MRSA به‌ترتیب 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 به‌دست 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.

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و کسب‌شده از جامعه می‌باشد. به‌دلیل قدرت بیماریزایی زیاد و مقاومت در برابر داروهای ضدمیکروبی به یکی از مهمترین مشکلات بهداشتی در دنیا تبدیل شده است.[۱] استافیلوکوکوس اورئوس باعث عفونت‌های چرکی متنوع و مسمومیت‌های غذایی در 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 می‌توانند در همه بافت‌های بدن زنده بماند، این دسته از میکروارگانیسم‌ها مسئول عفونت‌های گوناگونی در انسان است.[٤] با توجه به اینکه تعداد زیادی از بیماران بستری و



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05 ]

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 به‌واسطه تماس با ناقلین آن در بیمارستان‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.[۵و۶] در سه دهه گذشته، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) به‌عنوان 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 به‌وسیله گونه‌های MRSA هنوز به‌عنوان یک عامل پاتوژنز سخت به‌شمار می‌آید.[۱۰]

نخستین گونه‌های MRSA در سال ۱۹۶۱ ایزوله شده‌اند.[۱۱و۱۲] پس از مدتی، استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین به‌طور گسترده به‌عنوان 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.[۸و۱۲] 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.[۱۳و۱۴]

تایپینگ (Typing) سریع و دقیق استافیلوکوکوس اورئوس به‌منظور شناسایی انتقال این ارگانیسم 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.

## 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 به‌صورت 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، کواگولاز با استفاده از سرم سیتراته خرگوش (Liofilchem S.R.L., Roseto Degli Abruzzi, Italy) و تخمیر مانیتول روی محیط مانیتول سالت آگار (MAS) و آزمایش DNase تایید گردید. حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، تری‌متوپریم سولفامتاکسازول (۲۵ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، کلیندامایسین (۲ µg)، ریفامپین (۵ µg) و سفوکستین (۱۵ µg) با روش دیسک دیفیوژن آگار (MAST Laboratories Ltd., Bootle, Merseyside, UK) براساس معیارهای 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 ۲۰- °C ذخیره گردید. برای شناسایی ژن‌های *mec*A و *spa*، ۲ µl DNA استخراج شده به ۱۸ µl از مخلوط واکنش PCR اضافه گردید. به‌منظور تکثیر ژن *mec*A و *spa* از پرایمرهای زیر استفاده شد.[۱۷و۱۸]

*mec*A1: (R) GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA
*mec*A2: (F) CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA
*Spa*1: (R) ATCTGGTGGCGTAACACCTG
*Spa*2: (F) CGCTGCACCTAACGCTAATG

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



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05 ]

شامل: ۱- دمای ۹٤ °C به‌مدت یک دقیقه (Denaturation)، ۲- دمای ۵۵ °C به‌مدت یک دقیقه (Annealing)، ۳- دمای ۷۲ °C به‌مدت ۹۰ ثانیه (Extension)، دمای ۷۲ °C به‌مدت پنج دقیقه (Final extension) اعمال شد.

الکتروفورز محصولات PCR در ژل ۱/۵٪ به‌مدت ٦۰ دقیقه در ولتاژ ۱۱۰ ولت صورت گرفت. پس از اتمام الکتروفورز نتایج توسط UV transilluminator (Cleaver Scientific Ltd., Warwickshire, UK) مشاهده شد.

از مارکر ۱۰۰ bp (SinaClon BioScience Co., Tehran, Iran) برای تایید وزن مولکولی محصولات PCR استفاده گردید. به‌منظور انجام هضم آنزیمی در داخل یک میکروتیوپ استریل ۱ µl از محصولات PCR به‌همراه ۱ µl آنزیم محدودکننده *Rsa I* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) اضافه گردید، سپس ۲ µl بافر آنزیم x ۱۰ اضافه کرده و در نهایت ۱٦ µl آب مقطر استریل اضافه شد تا حجم نهایی به ۲۰ µl برسد، سپس میکروتیوپ‌های حاوی مواد گفته‌شده به‌مدت یک شب در ۳۷ °C انکوبه گردیدند. پس از این مدت میکروتیوپ‌ها برای غیرفعال شدن آنزیم به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰ °C انکوبه شدند.

در مرحله بعد محصولات هضم آنزیمی به‌مدت دو ساعت در ژل آگار ۲٪ در ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفوز گردیدند. از Chi-square test (P<۰/۰۵ معنادار) و 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 (٤۹/۵٪) و ۱۰۱ نفر زن (۵۰/۵٪) بودند. بیشترین نمونه‌های به‌دست‌آمده به‌ترتیب 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 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 *mec*A در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله‌شده ۵۰٪ بود. در بررسی ژن *spa* در بیماران و ناقلین مورد مطالعه، هشت محصول PCR به‌دست آمد (شکل ۱) که بیشترین فراوانی مربوط به تیپ $A_1$ (۱۲۰۰-۱۱۵۰ جفت باز) با فراوانی (٤٤/۵٪) ۸۹ و پس از آن $A_2$ (۱۳۰۰-۱۲۵۰ جفت باز) با فراوانی (٤۰/۵٪) ۸۱، $A_3$ (۱٤۰۰-۱۳۵۰ جفت باز)، $A_4$ (۱۵۰۰-۱٤۵۰ جفت باز)، به‌ترتیب با ۱٤ (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 (٦۰٪) از این الگوها در میان سویه‌های MSSA و MRSA 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 $A_4$ (۱۵۰۰-۱٤۵۰ جفت باز) یک تیپ منحصر به فرد در بیماران بستری بود که در سویه‌های جدا شده از ناقلین مشاهده نشد.

**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 |
| ریفامایسین (۵ µg) | ۱۵(۱۵٪) | ۸۵(۸۵٪) |
| جنتامایسین (۱۰ µg) | ۱۰(۱۰٪) | ۹۰(۹۰٪) |
| تراسایکلین (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*

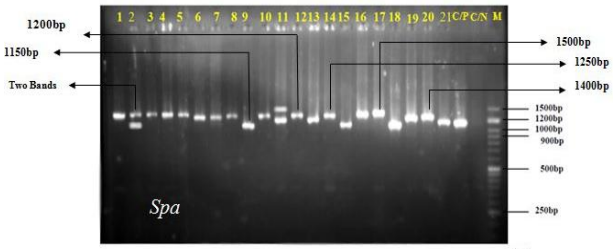


[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05 ]

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

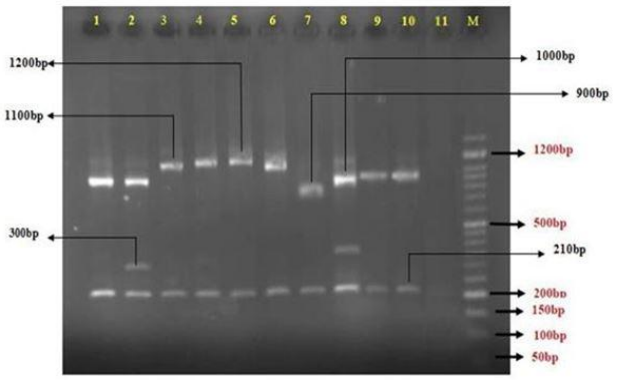
| محصول PCR * | سویه MRSA ** تعداد (٪) | سویه ناقلین تعداد (٪) | سویه MSSA *** بالینی تعداد (٪) | مجموع تعداد (٪) |
|---|---|---|---|---|
| بدون باند | ۲(٪۲) | ۱(٪۲) | – | ۳(٪۱/۵) |
| جفت باند | ۵(٪۵) | – | ۲(٪٤) | ۷(٪۳/۵) |
| ۱۱۵۰–۱۲۰۰ bp | ٦۰(٪٦۰) | ۵(٪۱۰) | ۲٤(٪٤۸) | ۸۹(٪٤٤/۵) |
| ۱۲۰۰–۱۳۰۰ bp | ۲٤(٪۲٤) | ٤۱(٪۷۰) | ۱٦(٪۳۲) | ۸۱(٪٤۰/۵) |
| ۱۳۵۰–۱٤۰۰ bp | ٦(٪٦) | ۲(٪٤) | ٦(٪۱۲) | ۱٤(٪۷) |
| ۱٤۰۰–۱۵۰۰ bp | ۳(٪۳) | ۱(٪۲) | ۲(٪٤) | ٦(٪۳) |
| مجموع | ۱۰۰(٪۱۰۰) | ۵۰(٪۵۰) | ۵۰(٪۵۰) | ۲۰۰(٪۱۰۰) |

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




**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 باز)، ردیف‌های ۲ و ۱۱ (محصول PCR دو باندی)، ردیف شماره ۹ (محصول PCR ۱۱۵۰ جفت باز)، ردیف شماره ۱۷ و ۱٦ (محصول PCR ۱۵۰۰جفت باز)، ردیف شماره ۱۹ و ۲۰ (محصول PCR ۱٤۰۰ جفت بازی)، ردیف شماره ٦ و ۷ و ۲۱ (محصول PCR ۱۲۰۰ جفت باز)، ردیف شماره ۱۵ و ۱۸ (محصول PCR ۱۱۵۰ جفت باز)، C/P (Control positive سویه ATCC 25923)، C/N (Control negative)، M سایز مارکر DNA




**شکل ۲: نتایج الکتروفورز PCR-RFLP محصولات ژن *spa* در برش با آنزیم *RsaI*.**. ردیف شماره ۱ (الگوی محصول ۱۲۰۰–۱۱۵۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۲ (الگوی محصول ۱٤۰۰–۱۳۵۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۳ و ٤ (الگوی محصول ۱۳۰۰–۱۲۵۰ جفت بازی)، ردیف شماره ۵ و ٦ (الگوی محصول ۱٤۵۰ 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)

همچنین $A_2$ (۱۳۰۰–۱۲۵۰ جفت باز) 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 به‌جهت اینکه در اثر آنزیم قطعات کوچکتری حاصل می‌شدند در الکتروفورز باندی مشاهده نشد. الگوهای برشی مشابهی در برخی سویه‌های جدا شده به‌دست آمد و در برخی سویه‌های جدا شده الگوهای برشی متفاوت مشاهده گردید. Chi-square test رابطه معناداری میان الگوهای به‌دست‌آمده از ژن *spa* با جایگاه عفونت و بخش‌های مختلف بیمارستانی نشان نداد. همچنین بر اساس آن توزیع فراوانی الگوهای به‌دست‌آمده در بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی همدان یکسان نبود (P<۰/۰۰۰۱) و الگوهای حاصل از PCR ژن *spa* در بیماران و پرسنل به‌منظور ردیابی منشای عفونت در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های مورد مطالعه استفاده شد رابطه معناداری را نشان نداد.



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05 ]

**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(٪٤٤/٥) |
| **۱۲۵۰–۱۳۰۰ bp** | ۱۱۰۰–۲۱۰ bp | ۸۱(٪٤۰/٥) |
| **۱۳۵۰–۱٤۰۰ bp** | ۱۰۰۰-۳۰۰–۲۱۰ bp | ١٤(٪٧) |
| **۱٤٥۰–۱٥۰۰ bp** | ۱۲۰۰–۳۰۰ bp | ٦(٪٣) |
| **مجموع** | – | ۱۹۰(٪۹۰) |

* Restriction fragment length polymorphism ** Base pair

## بحث

تیپ غالب در همدان دارای الگوی $A_1$ (۱۲۰۰–۱۱۵۰ 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 $A_1$ (۱۲۰۰–۱۱۵۰ 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 اریترومایسین داشتند.

در میان سویه‌های ناقلین نیز تیپ $A_2$ (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 ٤۰ 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 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 (۱٤۰۰bp–۱۲۰۰bp–۹۰۰bp–۸۰۰bp–٦٥۰bp) 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.[۱٥] 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 $A_1$ (۱۲۰۰–۱۱۵۰ جفت باز) و $A_2$ (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 می‌گذراند، 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.



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05 ]

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 ایـزوله‌های استافیـلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه‌های بیـماران بستری و پرسنل بیمارستان‌ها صورت گیرد.

*سپاسگزاری*: این مقاله بخشی‌از پایان‌نامه با عنوان "شناسـایی ژن‌هـای کدکننده آنزیم کواگولاز و پروتیین A در سویه‌های مقـاوم و حـساس بـه متی‌سیلین ایزوله‌شده از نمونه‌های بالینی و ناقلین" با کـد مـصوبه ۱۵۱۲ و سال ۱۳۹۲ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد.

## References

1. Sahm DF, Critchley IA, Kelly LJ, Karlowsky JA, Mayfield DC, Thornsberry 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.
2. 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.
3. Wisal ME, Hamid MA, Hadia EA, Jalii IM, Ali AS. Coagulase gene polymorphism of staphylococcus aureus strains isolated from human, animals and enviroment. *Pak J Biol Sci* 2005;8(2):278-80.
4. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(3):521-40.
5. 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.
6. Edoh V, Gadou D, Tia H, Gnonsahe D. Epidemiology and prevention of Staphylococcus aureus nasal carriage in patients and staff at the Cococy Hemodialysis Center in Abidjan, Ivory Coast. *Med Trop (Mars)* 2003;63(6):590-2.
7. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferro CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1768-72.
8. 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.
9. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39(4):273-82.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, et al. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994;32(3):846-7.
14. 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.
15. 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.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 21st Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI; 2013, M100-S21.
17. Shakeri F, Shojai A, Golalipour 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Moodley A, Oosthuysen W, Duse A, Marais E. Molecular characterization of clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates in South Africa. *J Clin Microbial* 2010;48(12):4608-11.
22. Emaneini 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.



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05 ]

TUMJ Tehran University Medical Journal, April 2015; Vol. 73, No. 1: 24-30 Original Article

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

Hassan Mahmoudi Ph.D. Student[1]
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*.



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05 ]