مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲٤، شماره۵، آذر و دی ۱۳۹۸(شماره پی در پی ۱۳٦)

الگوی ژنوتیپی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ایزوله شده از بینی ناقلین در بین کارکنان بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد شهر یاسوج به روش کواتایپینگ

فرزاد غریب پور جهان آباد[۱]، یاسر محمودی موردراز[۱]، پریا زنگنه[۱]، اصغر شریفی[۲]، محسن نغماچی[۲]، سجاد حسن زاده[۲]، سید سجاد خرم‌روز[۲*]

[۱]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* در سطوح مختلف بدن انسان از جمله پوست و غشای مخاطی به ویژه سوراخ‌های قدامی‌بینی کلونیزه می‌شود. در روش کواتایپینگ بر اساس پلی‌مورفیسم ژن کواگولاز(*coa*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* تیپ‌بندی می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین کواتایپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از سوراخ قدامی‌بینی در کارکنان بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد شهر یاسوج بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی، ۱۲۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از سوراخ قدامی‌کارکنان بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد جمع‌آوری شد. برای تایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ناحیه '۳ ژن *coa* به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. در نهایت محصولات PCR با آنزیمIII *Hae* تحت برش آنزیمی‌قرار گرفتند و بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شدند. سویه‌های باکتری بر اساس تفاوت در تعداد و اندازه باندهای DNA تیپ‌بندی شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: با تکثیر ژن *coa*، ۹ الگوی مختلف تک باندی به اندازه تقریبی ۴۰۰ تا ۸۶۰ جفت باز دیده شد. در بین باندهای مشاهده شده، باند ۶۱۰ جفت بازی در ۳۶ (۲۸/۸٪) ایزوله به عنوان تیپ غالب شناسایی شد. به دنبال برش آنزیمی ژن coa با آنزیمIII *Hae* ، ۱۵ الگوی متفاوت کواتایپ از شماره C1 تا C15 مشاهده شد. در بین الگوها، الگوی C3 با ۲۴ ایزوله، الگوی غالب بود. الگوی کواتایپ خاصی متعلق به بخش یا گروه شغلی خاصی در هیچ یک از بیمارستان‌های مورد مطالعه یافت نشد.

نتیجه‌گیری: *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از بینی کارکنان بیمارستان‌ها، تنوع ژنتیکی زیادی را در ژن *coa* خود نشان دادند، اما فقط تعداد کمی‌از کواتایپ‌ها به عنوان سویه غالب بودند. از آنجا که کوا تایپ غالبی در هیچ یک از بخش‌ها و گروه‌های شغلی یافت نشد، منبع باکتری‌ها برای کلونیزاسیون در سوراخ‌های قدامی‌بینی کارکنان بیمارستان‌ها احتمالاً در محیط خارج از بیمارستان است.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ناقلین بینی، کواتایپینگ، کارکنان مراکز درمانی

***نویسنده مسئول: سید سجاد خرم روز**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
Email: khoramrooz@gmail.com

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهم‌ترین پاتوژن‌های مسبب عفونت‌های بیمارستانی است که مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های موضعی و سیستمیک از قبیل؛ عفونت‌های بعد از عمل جراحی، عفونت زخم، عفونت‌های پوست و بافت نرم، پنومونی، اندوکاردیت، سندروم شوک سمی، استئومیلیت، آبسه‌ها و باکتریمی‌است. به دلیل افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی، درمان این باکتری به مشکلی جدی و نگران کننده در سیستم بهداشتی سلامت جهان مبدل شده است(۲ و ۱).

استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند در سطوح مختلف بدن انسان از جمله پوست و غشای مخاطی (به ویژه سوراخ‌های قدامی بینی که از مخازن اصلی آن نیز می‌باشد) و نیز سطوح تجهیزات پزشکی از جمله کتتر، ایمپلنت و ابزار درون عروقی کلونیزه شود. ناقلین بینی این باکتری می‌توانند موجب گسترش و انتقال عفونت در میان بیماران، بخش‌های بیمارستان و جامعه و حتی عفونت در خود فرد گردند. این ناقلین در سه دسته شامل؛ ناقلین پایدار(۱۰ تا ۳۵ درصد افراد سالم که اغلب یک سویه از باکتری را حمل می‌کنند)، ناقلین متناوب(۲۰ تا ۷۵ درصد افراد که به طور متناوب باکتری را حمل می‌کنند) و افراد غیر ناقل(۵ تا ۵۰ درصد افراد که هرگز این باکتری را حمل نمی‌کنند) تقسیم‌بندی می‌شوند و انتقال و گسترش این باکتری از بیمار به سایر بیماران و یا از پرسنل بیمارستان به بیماران و یکدیگر از طریق تماس(با دست‌ها) اتفاق می‌افتد(۳).

استراتژی‌های مورد استفاده برای جلوگیری از گسترش جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در بیمار و محیط نیازمند بررسی اطلاعات مربوط به گسترش و اپیدمیولوژی جدایه‌ها هم در بیمار، هم در محیط و هم در پرسنل بهداشت و درمان است. استفاده از سیستم‌های تایپینگ سریع و صحیح در رد گیری و محدود کردن گسترش باکتری‌ها در داخل بخش‌های یک بیمارستان و یا بین بیمارستان‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کند(۴). روش‌های مولکولی زیادی برای تایپینگ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس معرفی شده است، از قبیل انگشت نگاری DNA با روش Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)، که به عنوان یکی از روش‌های مطمئن با قدرت تفکیک‌گذاری بالا و تکرارپذیری مناسب و به عنوان روش استاندارد طلایی برای مطالعات منطقه‌ای می‌باشد(۵)، روش‌های مبتنی بر تعیین توالی DNA با روش PCR مانند coa-typing، spa typing، SCCmec typing و MLST نیز برای تیپ‌بندی باکتری وجود دارد.

تایپینگ بر اساس پلی‌مورفیسم ژن کواگولاز(*coa*) یک روش ساده، با درجه اطمینان بالا، دارای قدرت تکرارپذیر مناسب و با تفسیر آسان و تمایز دهنده برای تایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از منابع مختلف است(۶). آنزیم کواگولاز به وسیله غالب سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شود و از توانایی تولید این آنزیم در

آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی به منظور تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می‌شود و این آنزیم فاکتور بیماری‌زای مهمی در طی فرآیند عفونت است. فرم‌های آللی مختلف زیادی از ژن *coa* *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد که هر جدایه می‌تواند دارای یک تایپ coa باشد، ولی این تایپ‌ها منحصر به یک ایزوله خاص نیستند(۷). قدرت تمایزدهندگی تایپینگ ژن کواگولاز در ناحیه '۳ به تنوع محتوی ۸۱ جفت بازی کد کننده ژن کواگولاز بستگی دارد که هم از نظر تعداد جفت تکرارها و هم در موقعیت جایگاه‌های برش AluI و HaeIII بین جدایه‌های مختلف تفاوت دارد و در واقع توالی هدف برای برش آنزیم HaeIII، توالی ناحیه'5'GG↓CC3 می‌باشد که به تعیین ژنوتیپ‌ها کمک می‌کند، از این رو می‌توان با استفاده از روش تایپینگ ژن کواگولاز، جدایه‌های مختلف استافیلوکوکوس از هم متمایز نمود(۸). در ایران اطلاعات کمی درباره تنوع ژنتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیمارستان‌های مختلف وجود دارد. با توجه به شیوع باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان نرمال فلورا در نواحی مختلف بدن انسان به ویژه در ناقلین انسانی که باکتری را در حفره بینی حمل می‌کنند و عفونت‌های فراوانی که این باکتری می‌تواند ایجاد کند، به نظر می‌رسد که شناسایی مولکولی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ناقلین بینی در بین کارکنان بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد به روش coa-typing و اتخاذ پروتکل‌های کنترلی و درمانی مؤثر در ناقلین یک جامعه(اعم از پرسنل و بیماران ناقل) می‌تواند یکی از ضروری‌ترین گام‌ها برای جلوگیری از گسترش و کنترل عفونت باشد. با توجه به عدم انجام مطالعات مشابه پیشین در شهر یاسوج و ضرورت آگاهی از وضعیت تایپینگ مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در ناقلین این باکتری در پرسنل بیمارستانهای شهید بهشتی و امام سجاد شهر یاسوج، این مطالعه با هدف تعیین الگوی ژنوتیپی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ناقلین بینی پرسنل بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد شهر یاسوج به روش مولکولی کوا تایپینگ بود.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی ـ مقطعی، ۱۲۵ ایزوله باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* که از سوراخ بینی پرسنل بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد در سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری شده بود، انجام شد. نمونه‌گیری از کارکنان بیمارستان‌ها در مطالعه مورد بررسی با رضایت شخصی آنها انجام شد.

شناسایی مجدد باکتری‌ها به کمک تست‌های بیوشیمیایی شامل؛ کاتالاز، کواگولاز لوله ای، تخمیر قند مانیتول و تست DNAse انجام شد و به منظور شناسایی قطعی باکتری‌ها از روش ملکولی PCR و تکثیر ژن(nucA) استفاده شد.

به منظور تایپینگ *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کواتایپینگ، استخراج DNA به روش جوشاندن

انجام شد. بدین منظور چند کلنی از کشت تازه باکتری، در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه وارد شد و سپس با دستگاه ورتکس هموژنیزه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس در دستگاه ترموبلاک قرار داده شد و پس از این مدت زمان، میکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون به مدت ده دقیقه در سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شدند و مایع رویی حاوی ژنوم به عنوان DNA باکتری جداسازی گردید و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جهت بررسی حضور ژن *coa* از پرایمرهای طراحی شده به وسیله هوکی و همکاران و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شد(۹). به منظور بررسی حضور ژن *coa*، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل؛ ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس(آمپلیکون، دانمارک)، ۰/۳ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای رفت و برگشت و ۲/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده انجام شد.

شرایط واکنش PCR برای تکثیر و طویل‌سازی قطعات مورد نظر به صورت زیر بود، باز شدن اولیه دو رشته در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل شامل باز شدن دو رشته DNA در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ٥٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه و مرحله تکثیر و طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت مرحله تکثیر و طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٥ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد به مدت یکساعت در ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از رنگ‌آمیزی ژل آگارز با DNA safe stain (SMO Bio، تایوان)، به منظور مشاهده تک باند *coa* با اندازه‌های متنوع از تصویربرداری به کمک gel documentation (Major Science، تایوان) استفاده شد.

به منظور ژنو تایپینگ ژن *coa* با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده *Hae* III، محصول نهایی PCR به وسیله آنزیم‌های محدود کننده *Hae* III (جنابیوساینس، آلمان) مورد هضم آنزیمی‌قرار گرفت. این واکنش برای آنزیم مورد مطالعه در حجم ۳۰ میکرولیتر انجام گرفت. در ابتدا ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۵ میکرولیتر از ترکیب شامل؛ مقدار ۲ ..... آنزیم محدود کننده *Hae* III در حجم ۲ لاندا، ۳ میکرولیتر بافر آنزیم محدود کننده و در نهایت ۱۰ آب مقطر دیونیزه مخلوط گردید. سپس مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماخانه‌گذاری گردید. به منظور بررسی طول قطعات ایجاد شده، محصول PCR پس از هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

پس از بررسی و تأیید ملکولی ۱۲۵ ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* از هر دو بیمارستان

شهید بهشتی(۷۷ ایزوله) و بیمارستان امام سجاد(۴۸ ایزوله)، پلی‌مورفیسم ژن *coa* در ایزوله‌های بالینی مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی ملکولی این ژن، ۹ دسته محصول PCR با توجه به تنوع ژنوتیپی کوا به دست آمد. یک ایزوله با وزن تقریبی ۴۰۰ جفت باز (ژنوتایپ I)، ۳ ایزوله با وزن تقریبی ۴۵۰ جفت باز (ژنوتایپ II)، ۲۴ ایزوله با وزن تقریبی ۵۳۰ جفت باز (ژنوتایپ III)، ۳۶ ایزوله با وزن تقریبی ۶۱۰ جفت باز (ژنوتایپIV)، ۱۱ ایزوله با وزن تقریبی ۶۵۰ جفت باز (ژنوتایپV)، ۳۲ ایزوله با وزن تقریبی ۷۰۰ جفت باز(ژنوتایپVI)، ۳ ایزوله با وزن تقریبی ۷۴۰ جفت باز (ژنوتایپ VII)، ۱۲ ایزوله با وزن تقریبی ۷۸۰ جفت باز (ژنوتایپ VIII)و در نهایت ۳ ایزوله با وزن تقریبی ۸۶۰ جفت باز(ژنوتایپ IX) مشاهده شد. درصد توزیع فراوانی هر یک از محصولات PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

بعد از هضم محصولات PCR منطقه متغیر ژن *coa*، با استفاده از آنزیم *HaeIII* در ۱۲۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* در دو بیمارستان امام سجاد (ع) و شهید بهشتی در نهایت ۱۵ الگوی مختلف مشاهده شد. الگوی C3(۳۲۰ـ۲۱۰) با ۲۴ ایزوله(۱۹/۲ درصد)، الگوی C4 (۴۷۰ـ۱۴۰) با ۲۳ ایزوله(۱۸/۴ درصد) و الگوی C5 با ۱۳ ایزوله(۱۰/۴ درصد) بیشترین فراوانی را داشته‌اند. همچنین الگوی C1 ، الگوی C11 و C14 با تنها یک ایزوله (۰/۸ درصد) کمترین فراوانی را نشان داده‌اند(جدول ۲).

نتایج الگوی کواتایپینگ بر اساس گروه شغلی در هر دو بیمارستان مورد بررسی قرار گرفت. در ۴۸ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از پرسنل بیمارستان امام سجاد، ۱۰ الگوی مختلف یافت شد. در ۶ نفر پزشک که ناقل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند ۴ الگوی متفاوت شامل؛ C4 ,C10, C3 هر کدام یک ایزوله و الگوی C5 در سه ایزوله دیده شد. در گروه شغلی پرستاری در مجموع ۸ الگوی مختلف در بین ۳۰ فرد ناقل یافت شد که بیشترین فراوانی مربوط به C4, C9 و C5 به ترتیب با ۴، ۶ و ۷ ایزوله یافت شد. در پرسنل آزمایشگاه سه الگوی متفاوت C3, C1 و C7 در ۳ فرد ناقل باکتری یافت شد. در بخش شغلی خدماتی در بین ۹ نفر ۵ الگوی متفاوت کواتایپینگ شناسایی شد.

در ۷۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از پرسنل بیمارستان شهید بهشتی، ۱۲ الگوی مختلف مشاهده گردید. در ۴ نفر پزشک که ناقل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند ۳ الگوی متفاوت شامل؛ C3، دو ایزوله و C4 وC15 هر کدام یک ایزوله مشاهده شد. در گروه شغلی پرستاری هر ۱۲ الگوی مختلف در بین ۵۵ فرد ناقل یافت شد که بیشترین فراوانی مربوط به C3، C4 و C8 به ترتیب با ۱۰، ۹ و ۹ ایزوله یافت شد. در پرسنل آزمایشگاه سه الگوی متفاوت C4، C8 وC13 به ترتیب ۲، ۲ و یک نفر در ناقلین بینی باکتری یافت شد. در بخش شغلی خدماتی در بین ۱۳ نفر ۷ الگوی متفاوت کواتایپینگ شناسایی شد.

بر اساس بخش‌های مختلف نتایج الگوی کواتایپینگ ژن *coa* در هر یک از بیمارستان‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الگوی کواتایپینگ در ٤٨ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از پرسنل بیمارستان امام سجاد، ١٠ الگوی مختلف را نشان داد، که اغلب تنوع زیادی را نشان دادند. در ٨ بخش تجمیع شده؛ بیشترین تنوع الگو در بخش کلینیک(سرپایی)، اورژانس، اتفاقات اطفال با ٥ الگو، جراحی زنان، اتاق عمل، Postpartum و زایمان با ٥ الگو دیده شده است. در آزمایشگاه با وجود این که تنها سه ایزوله شناسایی شد هر سه ایزوله دارای الگوی کواتایپینگ متفاوتی بودند. الگوی کواتایپ C3 نیز در ٥ بخش از مجموع ٨ بخش مشاهده شد(جدول٣).

هم‌چنین در ٧٧ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از پرسنل بیمارستان شهید بهشتی، ١٢ الگوی مختلف را نشان داد که در بین پرسنل مختلف تنوع زیادی مشاهده شد. در ٨ بخش تجمیع شده، بیشترین تنوع الگو در بخش اورژانس، کلینیک(سرپایی)، سی‌تی‌اسکن، رادیولوژی با ٩ الگو و بخش تجمیع شده جراحی، نوروسرجری، اتاق عمل و سوختگی ٩ الگوی مختلف دیده شده است. در بخش داخلی، نورولوژی، دیالیز، کولیز و دفتر پرستاری هر یک ازایزوله شناسایی شده الگوی کواتایپینگ متفاوتی داشتند. الگوی کواتایپ C4 و C3 نیز به ترتیب در ٦ و ٥ بخش از مجموع ٨ بخش مشاهده شد(جدول ۴).

بحث

تایپینگ بر اساس پلی‌مورفیسم ژن کواگولاز(*coa*) یک روش ساده، با درجه اطمینان بالا، دارای قدرت تکرارپذیر مناسب و با تفسیر آسان و تمایز دهنده برای تایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از منابع مختلف است(٦). هدف از این مطالعه تعیین کواتایپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از سوراخ قدامی‌بینی در کارکنان بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد شهر یاسوج بود.

جدول١: الگوی تایپینگ ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس با روش کوا-تایپینگ در دو بیمارستان امام سجاد و شهید بهشتی

ردیف	تعداد ایزوله(درصد)	اندازه باند(جفت باز)	ژنوتایپ
١	١ (٠/٨٧)	۴٠٠	ژنوتایپ I
٢	٣ (٢/٤)	٤٥٠	ژنوتایپ II
٣	٢٤ (١٩/٢)	٥٣٠	ژنوتایپ III
٤	٣٦ (٢٨/٨)	٦١٠	ژنوتایپ IV
٥	١١ (٨/٨)	٦٥٠	ژنوتایپ V
٦	٣٢ (٢٥/٦)	٧٠٠	ژنوتایپVI
٧	٣ (٢/٤)	٧٤٠	ژنوتایپ VII
٨	١٢ (٩/٦)	٧٨٠	ژنوتایپ VIII
٩	٣ (٢/٤)	٨٦٠	ژنوتایپ IX
مجموع	١٢٥	٩ الگو	٩ تایپ

جدول ۲: فراوانی و تنوع هریک از تایپ‌های ژن *coa* در برش با آنزیم محدود کننده *Hae* III با روش PCR-RFLP در دو بیمارستان

اندازه محصول ژن کوا جفت *باز*	الگوی RFLP با آنزیم Hae III	کواتایپ	فراوانی کواتایپ
٤٠٠	٢٢٠–٢٨٠	C1	١
٤٥٠	٣٠٠–١٥٠	C2	٣
٥٣٠	٣٢٠–٢١٠	C3	٢٤
٦١٠	٤٧٠–١٤٠	C4	٢٣
	٢٤٠–٢١٠–١٧٠	C5	١٣
٦٥٠	٣٢٠–١٤٠–١٠٠–٨٠	C6	١٠
	٢٥٠–١٧٠–١٥٠	C7	١
٧٠٠	١٠٠+١٤٠+٤٦٠	C8	١٢
	١٤٠+١٨٠+٣٨٠	C9	١٢
	٨٠+١٠٠+١٤٠+٣٨٠	C10	٧
	١٧٠+٢١٠+٣٢٠	C11	١
٧٤٠	٣٨٠+٢٦٠+١٤٠	C12	٣
٧٨٠	١٤٠+٢٦٠+٣٨٠	C13	١١
	٣٢٠+٤٦٠	C14	١
٨٦٠	١٤٠+١٧٠+٢١٠+٣٤٠	C15	٣

جدول ۳: فراوانی هر یک از الگو ی کواتایپینگ ژن *coa* در برش با آنزیم محدود کننده *Hae* III با روش PCR-RFLP در بیمارستان امام سجاد به تفکیک بخش های بیمارستان

بخش	تعداد موارد ناقلین مثبت	تعداد الگو	فراوانی هر یک از الگو ی کواتایپینگ
کلینیک(سرپایی) / اورژانس / اتفاقات اطفال	١٤	٥	C3(2), C4(3), C5(6), C10(1), C12(2)
نوزادان/ اطفال	٣	٢	C9(2), C10(1)
آشپزخانه / حراست/ دفتر پرستاری	٥	٢	C3(2), C9(3)
NICU / ICU	٣	١	C9(3)
CCU	٢	١	C5(2)
آزمایشگاه	٣	٣	C1(1), C3(1), C7(1)
ENT– داخلی	٢	٢	C3(1), C9(1)
جراحی زنان / اتاق عمل / Postpartum / زایمان	١٦	٥	C3(4), C4(5), C6(2), C10(4), C14(1)
مجموع	٤٨		–

جدول ۴: فراوانی هر یک از الگو ی کواتایپینگ ژن *coa* در برش با آنزیم محدود کننده *Hae* III با روش PCR-RFLP در بیمارستان شهید بهشتی به تفکیک بخش‌های بیمارستان

بخش	تعداد موارد ناقلین مثبت	تعداد الگو	فراوانی هر یک از الگو ی کواتایپینگ
اورژانس / کلینیک(سرپایی) / سی تی اسکن / رادیولوژی	۲۵	۹	C3(3), C4(6), C6(4), C8(5), C9(1), C11(1), C12(1), C13(3), C15(1),
آزمایشگاه	۵	۳	C4(1), C8(1), C13(1)
جراحی / نوروسرجری / اتاق عمل / سوختگی	۲۶	۹	C2(1), C3(6), C4(4), C5(2), C6(3), C8(4), C9(1), C13(4), C15(1)
ICU	۶	۵	C2(1), C3(2), C5(1), C13(1), C15(1)
داخلی / نورولوژی	۵	۵	C4(1), C5(1), C8(1), C10(1), C13(1)
عفونی	۶	۵	C3(2), C4(1), C5(1), C6(1), C13(1)
دیالیز / کولیز	۲	۲	C3(1), C4(1)
دفتر پرستاری	۲	۲	C2(1), C9(1)
مجموع	۷۷		-

با توجه به حضور ناقلین بینی *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین کارکنان بیمارستان‌ها و مراکز درمانی و عفونت‌های فراوانی که این باکتری می‌تواند ایجاد کند به نظر می‌رسد که شناسایی مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ناقلین بینی کارکنان بیمارستان شهید بهشتی و امام سجاد به روش coa-typing و اتخاذ پروتکل‌های کنترلی و درمانی مؤثر در ناقلین یک جامعه(اعم از پرسنل و بیماران ناقل) می‌تواند یکی از ضروری‌ترین گام‌ها برای جلوگیری از گسترش باکتری و کنترل عفونت باشد.

در مطالعه حاضر ۹ الگوی ژنوتیپی با اندازه‌های ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۳۰،۶۱۰ ، ۷۰۰،۷۴۰، ۷۸۰ و ۸۶۰ جفت بازی مشاهده شد، که نشان دهنده وجود پلی‌مورفیسم در ایزوله‌های مورد بررسی بوده است که از این میان، الگوی ژنوتایپ ۶۱۰ جفت بازی و ۷۰۰ جفت‌بازی به ترتیب به میزان ۲۸/۸ و ۲۵/۶ درصد دارای بالاترین و الگوی ژنوتایپ ۴۰۰ جفت بازی به میزان ۰/۸۷ درصد دارای کمترین میزان شیوع ژنوتایپ ژن *کوا* بوده و این نتایج فراوانی بالای ژنوتایپ ۶۱۰ جفت بازی و ۷۰۰ جفت بازی را در بین ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از حفره بینی کارکنان بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد را نشان می‌دهد. در مقایسه ساعی و همکاران ۵ الگوی ژنی *coa* با اندازه‌های ۸۵۰ـ۴۹۰ جفت باز(۲۰ ±جفت باز) به دست آمده که الگوی ژنی ۶۸۰ (۱۴درصد) و ۸۵۰(۲۳ درصد) با بیشترین تعداد الگوی ژنی را به خودشان اختصاص داده‌اند، که این تعداد الگوی ژنوتایپی با مطالعه اخیر هم‌خوانی ندارد(۱۰). در مطالعه خرم روز و همکاران ۵ دسته محصول PCR با ژنوتایپ اندازه‌های ۵۳۰، ۶۱۰، ۷۰۰، ۷۸۰ و ۸۶۰ جفت بازی مشاهده شد. الگوی ژنوتایپ

۷۰۰ جفت بازی به میزان ۶۰/۳۳ درصد دارای بالاترین و الگوی ژنوتایپ ۸۶۰ جفت بازی به میزان ۴/۱۳ درصد دارای کمترین میزان شیوع ژنوتایپ ژن *کوا* را دارا بوده و این یافته‌ها شیوع بالا و الگوی غالب ژنوتایپ ۷۰۰ جفت بازی را در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده به وسیله آنها در شهر اهواز نشان داد. هر چند در مطالعه حاضر الگوی ژنوتیپی ۷۰۰ جفت بازی جز الگوهای غالب بود، ولی میزان فراوانی آن در مقایسه با اهواز بسیار کمتر بود و در مشابهت با مطالعه ذکر شده میزان فراوانی الگوی ژنوتیپی و ۸۶۰ جفت بازی دارای شیوع بسیار پایینی بوده است(۱۱).

در مطالعه رضا و همکاران ۴ الگوی ۴۳۰ الی ۷۹۰ جفت بازی به دست آمده است. به طوری که هر چند الگوی ۷۰۰ جفت بازی فراوانی بسیار بیشتری از مطالعه حاضر داشته است، ولی جزو الگوهای غالب ژنوتیپی می‌باشند و در مطالعه مورد اشاره الگوی ۵۳۰ جفت بازی تعداد الگوی کمتری را به خود اختصاص داده است که بر خلاف مطالعه حاضر می‌باشد(۱۲). بنابراین الگوی ژنوتایپی ۷۰۰ جفت بازی حضور خود را به عنوان یک عامل اتیولوژیک در غالب عفونت‌های مورد مطالعه نشان داده است. همچنین ممتاز و همکاران الگوی ۷۰۰ جفت بازی را گزارش کرده اند(۱۳). هوکی و همکاران الگوی ۶۶۰ (۲۰ ±جفت‌باز)، جان وتیانوچیت و همکاران الگوهای ۶۵۰ و ۷۳۰ جفت‌بازی، آسلانتاس و همکاران الگوی ۷۳۰ جفت بازی، سانجیو و همکاران الگوی ۶۸۰ (۲۰±جفت باز) را گزارش کرده‌اند(۱۷-۱۴).

البته در مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان در مورد پلی‌مورفیسم ژن *coa* انجام پذیرفته معمولاً ۴ و یا بیش از ۴ الگوی ژنتیکی حاصل از واکنش PCR مشاهده گردیده است که این تعدد در چند شکلی‌ها ممکن است به دلیل تعداد ایزوله‌های بالا و میزان الگوی مقاومت در مطالعات ذکر شده باشد.

در مطالعه حاضر به دنبال برش آنزیمی هر یک از الگوهای ژنوتیپی با آنزیم *HaeIII* در نهایت ۱۵ الگوی ژنوتیپی از C1 تا C15 به دست آمد. الگوی C3 (۳۲۰-۲۱۰) با ۲۴ ایزوله(۱۹/۲ درصد) بیشترین فراوانی و الگوی C11 و C14 با تنها یک ایزوله (۰/۸ درصد) کمترین فراوانی را نشان داده‌اند.

در مطالعه خرم روز و همکاران به دنبال برش آنزیمی با *HaeIII* در نهایت ۱۷ الگوی مختلف گزارش کردند که الگوی H9 (۳۲۰ -۲۱۰-۱۷۰) با (۲۵/۶۱ درصد) و همچنین الگوی H6 ، الگوی H13 و H17 (۳۲۰-۲۱۰) با تنها یک ایزوله (۰/۸۳ درصد) کمترین فراوانی را نشان داده‌اند(۱۱).

همچنین در مطالعه رضا با استفاده از آنزیم محدود کننده *HaeIII* تعداد ۶ الگوی متفاوت پس از برش آنزیمی مشاهده و گزارش شده است که بر خلاف مطالعه حاضر تعداد کمتری الگو به وسیله آنزیم محدود کننده تشکیل شده است(۱۲). در مطالعه خوش خرام و همکاران نیز ۲۷ و ۲۸ الگوهای RFLP مختلف برای آنزیم های محدود *AluI* و *HaeIII* با قدرت

تشخیص بهتر و هضم کامل محصولات ژن کواگولاز به وسیله آنزیم *HaeIII* نسبت به آنزیم *AluI* را گزارش کرده اند(۱۸). به نظر می‌رسد در مطالعه خوش خرام و همکاران به دلیل این که حجم نمونه‌ها بیشتر از مطالعه حاضر بوده است و هم‌چنین از سه بیمارستان مختلف و از نمونه‌های کلینیکی مختلف بوده است، تنوع ژنوتایپی بیشتری را نشان داده است.

در مقایسه بین بیمارستان نتایج الگوی کواتایپینگ نشان داد که در ۴۸ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی پرسنل بیمارستان امام سجاد، ۱۰ الگوی مختلف را نشان داد، در حالی که در بیمارستان شهید بهشتی در ۷۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده، ۱۳ الگوی مختلف را نشان داد. آنچه از نتایج کواتایپینگ دو بیمارستان مشاهده می‌شود این است که ژنوتایپ C3 در حفره بینی پرسنل هر دو بیمارستان ژنوتایپ غالب است و احتمالاً این ژنوتیپ دارای توانایی بالایی در کلونیزاسیون در حفره قدامی بینی است. بنابراین می‌توان با مطالعه سایر فاکتورهای مرتبط در این باکتری توانایی باکتری با چنین ژنوتایپی را در استقرار در حفره قدامی بینی بررسی کرد. با توجه به این که نمونه‌های باکتریایی مورد مطالعه همه از یک منبع یعنی حفره قدامی بینی جداسازی شده‌اند، ولی مشاهده می‌شود که دارای تنوع ژنوتیپی متفاوتی هستند و هم‌چنین با توجه به این که در بیمارستان شهید بهشتی که تعداد بیشتری باکتری جداسازی شده است، تنوع کواتایپ‌ها نیز بیشتر است. یک نتیجه احتمالی این است که با توجه به این تنوع کواتایپی، باکتری‌های کلونیزه شده در حفره بینی پرسنل این دو بیمارستان از منابع متنوعی علاوه بر منبع بیمارستان وارد حفره قدامی بینی شده‌اند.

آنچه از نتایج این مطالعه دیده می‌شود این است که الگوی خاصی از کواتایپ‌ها در گروه شغلی خاصی در هیچ یک از دو بیمارستان یافت نمی‌شود و از تایپ‌های مختلف در گروه‌های شغلی متفاوت دیده می‌شود. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به این که نوع کواتایپ در کلونیزاسیون باکتری‌ها در بینی پرسنل چندان اهمیتی ندارد و احتمالاً هریک از افراد با گروه شغلی متفاوت مستقل از شرایط شغلی به باکتری کلونیزه شده‌اند و شغل اهمیت چندانی در نوع کواتایپ باکتری ندارد. آن چیزی که اهمیت دارد این است که احتمالاً باکتری‌ها از منابعی وارد بینی پرسنل شده‌اند که خیلی تحت تأثیر محیط کار گروه‌های شغلی مختلف قرار نگرفته است. با توجه به این که در افراد شاغل خارج از بیمارستان نیز ناقلین بینی باکتری دیده می‌شود، راه ورود باکتری به بینی در محیط خارج از بیمارستان یعنی جامعه مطرح می‌شود.

به علاوه با توجه به تنوع کواتایپ‌ها بر اساس بخش‌های مختلف هر دو بیمارستان و عدم غالب بودن یک کواتایپ خاص، چنین استنباط می‌شود که پرسنل ناقل باکتری در هر یک از بخش‌های مختلف بیمارستان باکتری را از منابع دیگری به جز همکاران و محیط کاری خود کسب کرده‌اند و احتمال این که

کلون مشترکی در بین پرسنل یک بخش منتشر شده باشد دور از ذهن است و نشان دهنده این است که حداقل در مورد پرسنل بخش‌های مختلف اقدامات کنترل بهداشتی در جهت جلوگیری از انتقال باکتری بین پرسنل رعایت می‌شود و به عبارت دیگر باید منابع دیگری را به عنوان منبع ورودی باکتری به بینی جستجو کرد.

نتیجه‌گیری

تنوع ژنوتیپی در بین ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی پرسنل بیمارستان‌های شهید بهشتی و امام سجاد شهر یاسوج به روش کواتایپینگ بالاست. در دو بیمارستان به نظر می‌رسد تنوع ژنوتیپی زیادی در بخش‌های مختلف بیمارستان دیده می‌شود و یک الگوی غالب کواتیپینگ در یک بخش دیده نمی‌شود. از طرف دیگر بر اساس گروه شغلی در هر دو بیمارستان، نیز کواتایپ خاصی در هیچ گروه شغلی غالب نیست و تنوع زیادی دیده می‌شود. لذا چنین استنباط می‌شود که پرسنل ناقل باکتری در هر یک از بخش‌های مختلف بیمارستان باکتری را از منابع دیگری به جز همکاران و محیط کاری خود کرده اند و احتمال این که کلون مشترکی در بین پرسنل یک بخش منتشر شده باشد دور از ذهن است و نشان دهنده این است که حداقل در مورد پرسنل بخش‌های مختلف اقدامات کنترل بهداشتی در جهت جلوگیری از انتقال باکتری بین پرسنل رعایت می‌شود و به عبارت دیگر باید منابع دیگری را به عنوان منبع ورودی باکتری به بینی جستجو کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع دکتری حرفه ای رشته پزشکی عمومی با کد اخلاق IR.yums.rec.1394.5 به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد، که با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج به انجام رسیده است.

REFRENCES

1-Hauschild T, Sacha P, Wieczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Tryniszewska E. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus from University Hospital in Bialystok, Poland. Folia Histochem Cytobiol 2008; 46(2): 225-8.
2.Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J. Evaluation of biofilm production and prevalence ofthe icaD gene in methicillin-resistant and methicilln usceptible Staphylococcus aureus strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50(3): 375-9.
3.Kluytmans JA, Wertheim HF. Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. Infection 2005; 33(1): 3-8.
4.Li QT1, Zhu YZ, Dong K, Liu C, Zhou YH, Ni YX, Guo XK. A novel sequence-based coa genotyping method to discriminate nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. Ir J Med Sci 2011;180(2): 463-8.
5.Sabat A, Malachowa N, Miedzobrodzki J, Hryniewicz W. Comparison of PCR-based methods for typing Staphylococcus aureus isolates. J Clin Microbiol 2006; 44(10): 3804-7.
6.Ishino K, Tsuchizaki N, Ishikawa J, Hotta K. Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 607-9.
7.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.
8.Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol 1992; 30: 1642–5.
9.Hookey JV, Edwards V, Cookson BD, Richardson JF. PCR-RFLP analysis of the coagulase gene of Staphylococcus aureus:application to the differentiation of epidemic and sporadic methicillin-resistant strains. J Hosp Infect 1999; 42: 205–12.
10.Saei HD, Ahmadi M, Mardani K, Batavani RA. Molecular typing of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. Vet Microbiol 2009; 137(1-2): 202-6.
11.Khoramrooz SS, Dolatabad SA, Dolatabad FM, Marashifard M, Mirzaii M, Dabiri H, et al. Detection of tetracycline resistance genes, aminoglycoside modifying enzymes, and coagulase gene typing of clinical isolates of staphylococcus aureus in the Southwest of Iran. Iran J Basic Med Sci 2017; 20(8): 912-9.
12.Talebi-Satlou R, Ahmadi M, Dastmalchi Saei H. 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): 416-20.
13.Momtaz H, Tajbakhsh E, Rahimi E, Momeni M. coagulase gene polymorphism of Staphylococcus aureus isolated from clinical and sub-clinicalbovine mastitis in Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces of Iran. Comp Clin Path 2011; 20(5): 519-22.
14.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.
15.Janwithayanuchit I, Ngam-ululert S, Paungmoung P, Rangsipanuratn W. Epidemiologic study of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by Coagulase Gene Polymorphism. Science Asia 2006; 32: 127-32.
16.Aslantaş Ö, Demir C, TürütoğLu H, Cantekin Z, Ergün Y, Doğruer G. Coagulase gene polymorphism of Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2007; 31(4): 253-7.
17.Sanjiv K, Kataria AK, Sharma R, Singh G. Epidemiological typing of Staphylococcus aureus by DNA restriction fragment length polymorphism of coa gene. Veterinarski Arhiv 2008; 78(1): 31.
18.KhoshkharamRoodmajani H, Sarvari J, Bazargani A, KandekarGhahraman MR, NazariAlam A, Motamedifar M. Molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureusisolates from Shiraz teaching hospitals by PCR-RFLP of coagulase gene. Iran J Microbiol. 2014 Aug;6(4):246-52.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Genotyping Pattern of *Staphylococcus aureus* Isolated From Nasal Carriers Among Health Care Workers in Two Hospitals (Imam Sajjad and Shahid Beheshti) in Yasuj City Using Coa-Typing Method

Gharibpour Jahanabad F[1], Mahmoudi- mourderaz Y[1], Zanganeh P[1], Sharifi A[2], Naghmachi M[2], Hasanzadeh S[2], Khoramrooz SS[2*]

[1]Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 01 Marc 2019 Accepted: 09 Jun 2020

Abstract

Background & aim: *Staphylococcus aureus* can colonize a variety of body sites such as skin, coetaneous membrane and especially the anterior nares. The coagulase gene (*coa)* typing is a technique in which the organism is typed based on the polymorphic region of the *coa* gene. The aim of the present study was to determine the *coa* based typing of *S. aureus* isolates from health care workers in two teaching hospitals in Yasuj city.

Methods: In the present cross- sectional study, a total of 125 *S. aureus* isolates were collected from the nasal nares of healthcare workers in Shahid Beheshti and Imam Sajjad Hospitals in Yasuj city. For typing of *S. aureus* isolates, amplification of the 3'-end region of the coa gene was performed. Finally, PCR products were digested with *HaeIII* restriction enzymes and then were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and visualized under UV illumination. Bacterial strains were typed according to the DNA bands with diverse size and numbers in each strain. Data were analyzed by descriptive statistics tests.

Results: Amplification of the *coa* gene indicated single band in nine different patterns ranging approximately from 400 to 860 base pair. The *coa* gene with 610 bp size was seen in 36 isolates and was considered a predominant type. After digestion of PCR products with *HaeIII* restriction enzymes, totally 15 distinct *coa* gene RFLP patterns, numbered C1 to C15, were *coa* observed. The C3 was the most frequent *coa* type with 24 isolates. There is no specific types belong to wards or professions in each hospitals.

Conclusion: *S. auras* isolated from anterior nares of HCWs showed genetic diversity in their *coa* gene, but only a few *coa* gene variants were predominant. Hence no prominent *coa* type was detected according to the wards or types of profession, the sources of bacteria for colonization in anterior nares of HCWs may be related to the hospital, probably the outside environment.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Nasal Carrier, Coa Typing**,** Health Care Workers

***Corresponding Author: Khoramrooz SS,** Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
Email: khoramrooz@gmail.com

Please cite this article as follows:
Gharibpour Jahanabad F, Mahmoudi- mourderaz Y, Zanganeh P, Sharifi A, Naghmachi M, Hasanzadeh S, Khoramrooz SS. Genotyping Pattern of *Staphylococcus aureus* Isolated From Nasal Carriers Among Health Care Workers in Two Hospitals (Imam Sajjad and Shahid Beheshti) in Yasuj City Using Coa-Typing Method. Armaghane-danesh 2020; 24(5): 807--819