

تنوع ژنتیکی ژن استافیلوکوکاگولاز ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از عفونت‌های ادراری و خون

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۴ ویرایش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۲۴ آنلاین: ۱۳۹۸/۰۴/۳۱

مهرداد محمدی*

جمشید فقری

گروه میکروپ و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل بیماری‌زای متداول در انسان است که طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها را ایجاد می‌کند. آنزیم کوآگولاز از عوامل مهم بیماری‌زای این باکتری می‌باشد. همچنین بررسی تنوع ژنتیکی ژن کدکننده این آنزیم (*Coa*) یکی از روش‌های مولکولی تعیین تیپ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. **روش بررسی:** در این مطالعه مقطعی، از اسفند ۱۳۹۶ تا مهر ۱۳۹۷، ۱۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های ادرار و خون از بیمارستان‌های آموزشی الزهرا و امام حسین (ع) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از تایید نوع باکتری نمونه با قطعه ژنومی *Coa*، برای تعیین تیپ کوآگولاز منطقه بسیار متغیر ژن این آنزیم در واکنش (PCR) Polymerase chain reaction تکثیر و سپس مورد هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم اندونوکلاز محدودگر *AluI* قرار گرفت و تنوع طول قطعات هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۱۵۰ نمونه ۴۵ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس با تست‌های بیوشیمیایی تایید و از این تعداد ۳۶ (۸۰٪) نمونه‌ها حامل ژن کوآگولاز بودند. در بین الگوهای PCR، الگوی bp680 در ۲۰ نمونه و الگوی bp750 در ۱۶ نمونه به دست آمدند. پس از هضم آنزیمی برای آزمون Restriction fragment length polymorphism (RFLP)، چهار الگو به دست آمدند که الگوی ۴۰۰+۲۸۰ در ۱۶ نمونه (۴۴/۴٪)، الگوی ۴۷۰+۲۸۰ در ۷ نمونه (۱۹/۴٪)، الگوی ۳۴۰+۳۴۰ در ۶ نمونه (۱۶/۶٪)، الگوی بدون هضم ۷۵۰ در ۷ نمونه (۱۹/۶٪) می‌باشند.

نتیجه‌گیری: با استفاده از آزمایشات صورت گرفته مشخص گردید که الگوی PCR-RFLP، ۴۰۰+۲۸۰ جفت بازی الگوی غالب در نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در اصفهان می‌باشد.

کلمات کلیدی: کوآگولاز، پژوهش‌های مقطعی، ژنوتیپ، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، استافیلوکوکوس اورئوس.

* نویسنده مسئول: اصفهان، میدان آزادی، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی.

تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۲۹۰۲۱

E-mail: mehrdad.mohammadi1984@gmail.com

مقدمه

استافیلوکوک تنها جنس در خانواده میکروکوکاسیه می‌باشد که اهمیت پزشکی دارد. آن‌ها رایجترین ارگانیسم‌ها در پزشکی هستند^۱. باوجود عرضه عوامل ضد میکروبی و بهبودی بهداشت (که نقش موثری در کاهش شیوع و مرگ‌ومیر بیماری‌های استافیلوکوکی در قرن بیستم داشته است) هنوز استافیلوکوک‌ها به‌عنوان بیماری‌زاهای مهم

بیمارستانی باقی مانده‌اند.^۱ آن‌ها مسئول بیش از ۸۰٪ از بیماری‌های چرکی می‌باشند که در بالین بیمار یافت می‌شوند و پس از اشرشیاکالی، دومین علت عفونت‌های بیمارستان بستر 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. امروزه عفونت‌های ایجاد شده به‌وسیله استافیلوکوک اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین

استفاده قرار گیرد. تفاوت‌های ناشی از این چند شکلی‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در میزبان پاتوژن و یا تفاوت در مخازن این باکتری باشد.^۷

استفاده از تکنیک PCR-RFLP و هضم آنزیمی ژن کوآگلواز به دلیل سهولت و سرعت بالا به‌طور گسترده‌ای جهت تعیین ژنوتیپ جدایه‌های بالینی در آزمایشگاه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش PCR-RFLP یک روش مناسب جهت طبقه‌بندی نمونه‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس می‌باشد. این روش افزون‌بر ارابه نتایج آسان، ارزان و مناسب جهت مطالعات اپیدمیولوژیک، قادر به تمایز بین گونه‌های اپیدمیک و اسپورادیک در جنس خاصی از باکتری‌ها می‌باشد.^۶

روش آنتی‌بیوگرام و ارتباط این تست با الگوهای PCR و RFLP ژن *Coa* یک روش مناسب جهت تایپینگ مولکولی می‌باشد، ولی مشکلی که این روش دارد این است که ژن‌های مربوط به مقاومت ممکن است خارج کروموزومی باشد. بنابراین جهت تایپینگ با این روش فقط ژن‌های مقاومت داخل کروموزومی (ژن *mec A* در MRSA) این پتانسیل را از خود نشان می‌دهند.^{۷-۴}

در پژوهش حاضر ۱۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از نظر پلی‌مورفیسم در ژن *Coa* بررسی، وجود و عدم وجود ارتباط معنادار بین ژنوتیپ *Coa* و نوع عفونت بالینی (موضعی یا سیستمیک بودن آن) بررسی گردید.

روش بررسی

نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های خون، ادرار بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های مراکز درمانی الزهرا و امام حسین (ع) شهر اصفهان از اسفند ۱۳۹۶ تا مهر ۱۳۹۷، جمع‌آوری گشته و به آزمایشگاه منتقل گردید. یک کلنی از باکتری مورد مطالعه بر محیط به‌صورت خطی کشت داده شد. پس ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون، در حرارت ۳۷ °C انکوبه گردید. در این محیط در نتیجه تخمیر مانیتول در اطراف کلنی‌های استافیلوکوک اورئوس هاله زرد رنگ مشاهده می‌گردد.

روی یک گوشه از لام شیشه‌ای یک قطره سرم فیزیولوژی را به عنوان کنترل و در گوشه دیگر یک قطره پلاسما قرار داده شد. با لوپ

چالش بزرگی برای سیستم بهداشت و درمان بوده و میزان بسیار بالایی از مرگ‌ومیر بیمارستانی را به خود اختصاص داده است.^{۳-۱}

تایپینگ مولکولی می‌تواند نقش بسزایی را در مطالعات اپیدمیولوژیک عفونت‌های بیمارستانی بازی کند. با آگاهی از این مطلب در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته ژنوتیپینگ بخش چشمگیری از مطالعات سیستم بهداشت و درمان را به خود اختصاص داده تا از آن‌ها در کنترل عفونت‌ها بهره ببرند.^۴

مولکولار تایپینگ نقش اساسی در مطالعات اپیدمیولوژیک عفونت‌های فرصت‌طلب ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس دارد. در سال‌های اخیر روش‌های متنوعی از تکنیک‌های مولکولی برای ژنوتیپینگ ارابه شده‌اند همانند الکتروفورز پالس فیلد، الکتروفورز آنزیمی با لوکوس متعدد (MLEE)، تیپ‌بندی توالی با لوکوس متعدد (MLST)، تیپ‌بندی با ژن *Spa* و ژنوتیپ‌بندی کوآگلواز.^{۵-۲}

روش الکتروفورز پالس فیلد 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) روش‌های کارا در تایپینگ مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.^{۶-۴}

ژن *Coa* که پروتیین کوآگلواز را کد می‌کند به‌علت داشتن توالی‌های متغیر در ناحیه کدکننده^۲ بسیار پلی‌مرف 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 سیستم‌های نظارتی بوده و ابزار مهمی در مطالعه خواستگاه سویه‌ها، تعیین ارتباط کلون‌ها و اپیدمیولوژی موارد شیوع است.^۷

به‌دلیل وجود چند شکلی در ژن کوآگلواز که با تکنیک PCR-RFLP قابل ردیابی است می‌توان نتیجه گرفت که این روش می‌تواند در مطالعه ژنوتیپ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به منظور ردیابی منبع و خواستگاه این چند شکلی‌ها برای اهداف اپیدمیولوژیک، مورد

حباب‌های گاز اکسیژن مورد بررسی قرار می‌گیرد. حباب‌های مشاهده شده نشان‌دهنده وجود آنزیم کاتالاز در میکروارگانیسم است که موجب شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردد.

باکتری مورد مطالعه در محیط DNase test agar به صورت لوب پراکشت داده شده، سپس پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه می‌گردند. پس از انکوباسیون، روی پلیت‌های DNase test agar ساده، معرف تولوئیدین بلو ۱/۰٪ ریخته و سطح پلیت به‌طور کامل با این ماده پوشانده می‌شود. در نمونه‌های مثبت هاله‌های شفاف کاملاً مشخصی اطراف کلنی یا محل تلقیح در محیط کشت مشاهده می‌گردد.

جهت استخراج از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت (Genomic DNA extraction kit, CinnaGen, Tehran, Iran, Cat. # PR881614) استفاده گردید. براساس دستورکار کیت، از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط نوترینت آگار استفاده گردید. در این آزمایش از پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی نهایی باکتری استافیلوکوک اورئوس با استفاده از ژن کوآگولاز و تایید آن با استفاده قطعه ژنومی 23S rRNA با تکنیک PCR، استفاده گردید (جدول ۱).^۸

استریل مقداری از کلنی باکتری در هر یک از دو قطره مخلوط گردید تا سوسپانسیون یکنواختی تهیه گردد. سپس از نظر تشکیل لخته هر دو قطره بررسی گردید. استافیلوکوک اورئوس موجب تجمع سریع و تشکیل لخته در لام می‌گردد. در صورتی که سوسپانسیون در شکل یک محلول شیری رنگ صاف و یکنواخت باقی بماند نشان از منفی بودن تست دارد.

۳-۴ ml پلاسمای حاوی ضد انعقاد انسان در یک لوله آزمایش استریل ریخته شد. باکتری مورد مطالعه در آن کشت داده شد و به مدت ۱ تا ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C نگهداری و مرتب از نظر تشکیل لخته بررسی گردید. اگر پس از این مدت زمان تشکیل لخته در لوله آزمایش مشاهده نشد. برای یک شب در حرارت اتاق باقی می‌گذاریم. ارگانیسم‌هایی که نتوانند پلاسما را در مدت ۲۴ ساعت لخته کنند به‌عنوان کوآگولاز منفی در نظر گرفته می‌شوند.

با استفاده از اپلیکاتور چوبی، مقدار کمی از کشت خالص ارگانیسم از محیط آگار مغذی به سطح یک لام خشک و تمیز منتقل می‌گردد. بلافاصله یک قطره از پراکسید هیدروژن ۳٪ (H₂O₂) بر روی کلنی‌های موجود بر روی سطح لام ریخته از نظر آزاد شدن

جدول ۱: سکانس‌های پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های *Coa* و *23S rRNA* در استافیلوکوک اورئوس

منبع	اندازه محصول واکنش (bp)	توالی‌های پرایمرها (5'-3')	جفت پرایمرهای مورد استفاده
Hookey و همکاران ^{۱۳}	۶۷۳	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	<i>Coa</i> forward <i>Coa</i> reverse
Hookey و همکاران ^{۱۳}	۱۲۵۰	ACGGAGTTACAAAGGACGAC AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	23Sr RNA forward primer 23S r RNA reverse primer

دمای اتصال برای تکثیر هر دو ژن ۵۷ °C در نظر گرفته شد.

جدول ۲: برنامه دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن *Coa* / *23S rRNA*

نام مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تعداد تکرار چرخه
Initial Denaturation	۹۴	۴	یک بار
Denaturation	۹۴	۱	۳۰ بار
Annealing	۵۷	۱	
Extention	۷۲	۱	
Final extention	۷۲	۱۰	یک بار

اورئوس شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفت. درصد فراوانی باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی ادرار ۲۶/۶٪ و از نمونه‌های خون برابر با ۲۱٪ می‌باشد.

تمامی ۴۵ نمونه استافیلوکوک اورئوس با استفاده از PCR ژن 23S rRNA مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند که پس از الکتروفورز ژل آگارز باندهایی با وزن مولکولی کمابیش ۱۲۵۰ جفت باز حاصل شد.

از تکثیر منطقه متغیر ژن کوآگلواز ۳۶ بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در واکنش PCR دو دسته محصول با طول باند bp680 (۵۶٪)، که از ۲۰ نمونه به دست آمده ۵ نمونه از کشت خون و ۱۵ نمونه از ادرار می‌باشد و bp750 (۴۴٪) که از ۱۶ نمونه به دست آمده، ۱۱ نمونه از کشت خون و ۵ نمونه از کشت ادرار می‌باشد، به دست آمدند (شکل ۲).

از هضم محصولات PCR منطقه متغیر ژن *Coa* ۳۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از آنزیم Alu I در نهایت ۴ الگوی مختلف مشاهده گردید (شکل ۳ و ۴). فراوانی این الگوهای به دست آمده از نمونه‌ها بدین صورت می‌باشد که ۱- الگوی ۴۰۰+۲۸۰ در ۱۶ نمونه (۱۹/۴٪)، ۲- الگوی ۴۷۰+۲۸۰ در ۷ نمونه (۱۹/۴٪)، ۳- الگوی ۳۴۰+۳۴۰ در ۶ نمونه (۱۶/۶٪)، ۴- الگوی بدون هضم ۷۵۰ در ۷ نمونه (۱۹/۶٪).

تست آنتی‌بیوگرام بر روی تمامی نمونه‌های موردنظر از استافیلوکوک اورئوس‌ها انجام پذیرفت که نتایج درصد مقاومت هر یک از نمونه‌های مختلف نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به صورت زیر می‌باشد:

کلیندامایسین ۲۳٪، سفازولین ۲۳٪، جتتامایسین ۱۰٪، کلوگزاسیلین ۵۳٪، آمپی‌سیلین ۷۳٪، نیتروفورنتائین ۲۷٪، ونکومایسین ۷٪، کوتریموکسازول ۱۳٪، سیپروفلوکساسین ۱۷٪، اریترومایسین ۴۷٪، سفالکسین ۱۳٪، متی‌سیلین ۷۵٪، آموکسی‌سیلین ۶۰٪، آموکسی‌کلاو ۲۷٪، سفالتین ۴۷٪، تتراسایکلین ۲۰٪.

در بین الگوهای PCR: الگوی bp680 که در ۲۰ نمونه مشاهده شده بود، ۱۲ نمونه (۶۰٪) مقاوم به متی‌سیلین بودند و الگوی bp750 که در ۱۶ نمونه مشاهده شده بود، هشت نمونه (۵۰٪) مقاوم به متی‌سیلین بودند و در بین الگوهای RFLP: الگوی ۴۰۰+۲۸۰ که در ۱۶ نمونه مشاهده شده بود هشت نمونه (۵۰٪) مقاوم به متی‌سیلین

در این آزمایش از آنزیم AluI (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) استفاده گردید. در نواحی از ژن که دارای توالی AGCT باشد بین بازهای G و C برش ایجاد می‌کند. مقدار ۱۰ μl از محصول PCR درون میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری ریخته شد، سپس ۱۸ μl آب Nuclease-free، آنزیم AluI و Buffer Tango 10X هر کدام ۲ μl به آن اضافه گردید. پس از مخلوط کردن اجزای واکنش میکروتیوب به مدت ۱۶ ساعت، در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. پس از ۱۶ ساعت ویال به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۶۵ °C قرار گرفت تا فعالیت آنزیم AluI مهار گردد. در نهایت محصول با انجام عمل الکتروفورز بر روی ژل آگارز مشاهده گردید.^۹

در ابتدا حدود ۵ cc از محیط کشت مولر هیتتون برات درون لوله آزمایش ریخته و استریل شد. سپس به منظور ایجاد کدورت ۰/۵ مک فارلند مقداری از کشت ۲۴ ساعته باکتری با استفاده از لوپ استریل در این محیط تلقیح شد. در مرحله بعدی سواب استریل را به محیط کشت نوترینت برات حاوی باکتری مورد نظر وارد کرده سپس به صورت چمنی بر روی محیط مولر هیتتون آگار کشت انجام گردید. سپس بلافاصله با استفاده از پنس استریل دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (شرکت پادتن طب) شامل: کلیندامایسین، سفازولین، جتتامایسین، کلوگزاسیلین، آمپی‌سیلین، نیتروفورنتوئین، ونکومایسین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، سفالکسین، متی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، آموکسی‌کلاو، سفالتین و تتراسایکلین بر روی محیط مولر هیتتون آگار قرار داده شدند. این دیسک‌ها به فاصله ۲ cm از دیسک مجاور و ۲ cm از لبه پلیت بر روی محیط کشت قرار داده شدند. سپس محیط کشت مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت میزان مقاومت یا حساسیت باکتری‌ها با اندازه‌گیری قطر حاله عدم رشد مشخص گردید.

یافته‌ها

در این بررسی ۴۵ نمونه از باکتری‌های کوکسی گرم مثبت تخمیر کننده مانیتول در محیط مانیتول سالت آگار با قابلیت تولید آنزیم‌های کاتالاز، کوآگلواز، همولیزین و DNase به‌عنوان استافیلوکوکوس

باتوجه به یافته‌های Talebi-Satlou, Tiwari و همکارانشان می‌توان به این نتیجه رسید که یک زیر مجموعه ژنتیکی در نمونه‌های استافیلوکوک اورئوس به‌طور ویژه برای ایجاد عفونت در نقاط مختلف بدن به خوبی سازگار شده است. این در حالی است که نوع سازگاری های ژنتیکی بین گونه‌های مختلف از باکتری‌ها به‌طور چشمگیری می‌تواند متفاوت باشد و عوامل مختلفی ممکن است در این نوع سازگاری نقش داشته باشند.

در مورد ارتباط الگوهای PCR و RFLP و حساسیت و مقاومت نمونه‌ها نسبت به متی‌سیلین، ۵۰٪ از نمونه‌های دارای الگوی PCR ۷۵۰ جفت بازی و ۶۰٪ از نمونه‌های دارای الگوی PCR ۶۸۰ جفت بازی نسبت به متی‌سیلین مقاومت نشان دادند.

در بین الگوهای RFLP، نمونه‌های دارای الگوی ۴۷۰+۲۸۰ حاصل هضم آنزیمی الگوی PCR ۷۵۰ جفت بازی نسبت به متی‌سیلین مقاومت ۱۰۰٪ را از خود نشان دادند و در الگوی RFLP، نمونه‌های دارای الگوی ۴۰۰+۲۸۰ حاصل هضم آنزیمی الگوی PCR ۶۸۰ جفت بازی مقاومت ۵۰٪ را نسبت به متی‌سیلین از خود نشان دادند.

در مطالعات مشابه انجام گرفته توسط Hookey و همکاران، پس از انجام عمل هضم آنزیمی ژن Coa بر روی باکتری‌های مختلف، ۱۰ الگوی متفاوت ایجاد گردید که از میان این ۱۰ الگو، ۴ الگو فقط در نمونه‌های MRSA مشاهده گردید.^{۱۳}

همچنین در مطالعات Boswihi, Janwithayanuchit, Tiwari و همکارانشان غالبیت نسبی الگوهای PCR-RFLP خاص در نمونه‌های MRSA مشاهده گردید.^{۱۴، ۲۱، ۲۲} از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تکنیک PCR-RFLP روشی آسان جهت تعیین تیپ‌های استافیلوکوک اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین بوده و نتایج بیانگر تنوع ژن کوآگلواز در نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در منطقه اصفهان می‌باشد و الگوی PCR-RFLP ۴۰۰+۲۸۰ جفت بازی الگوی غالب بوده است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی به‌عنوان "بررسی الگوی توزیع ژنتیکی ژن‌های کوآگلواز در بیماری‌های عفونی منطقه مرکزی ایران" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان در سال ۱۳۹۷ به کد ۳۹۹۴۲۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان اجرا شده است.

همکاران الگوی ۶۸۰ جفت بازی را مشاهده کرده‌اند.^{۱۷-۱۳} البته در مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان در مورد پلی‌مورفیسم ژن Coa انجام پذیرفته کمابیش 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 نمونه‌های بالا در مطالعات ذکر شده باشد. در مطالعه حاضر در بین ۴ الگوی مشاهده شده حاصل از واکنش RFLP، بیشترین شیوع مربوط به الگوی ۴۰۰+۲۸۰ و کمترین شیوع، مربوط به الگوی ۴۷۰+۲۸۰ می‌باشد. که الگوهای کمابیش مشابه با این دو ژنوتایپ در مطالعات Momtaz و همکاران که الگوی ۴۹۰+۲۴۰ و Aslantas و همکاران که الگوی ۴۹۰+۲۴۰ را مشاهده کرده‌اند به چشم خورده است.^{۱۱، ۱۵}

الگوی تک بانده ۳۴۰ جفت بازی (حاصل هضم آنزیمی محصول PCR ۶۸۰ جفت بازی) که نشان‌دهنده ۲ بانده روی هم افتاده ۳۴۰ جفت بازی می‌باشد که نمونه این نوع الگو در مطالعات Sanjiv و همکاران با الگوی تک بانده ۳۰۰ جفت بازی که حاصل هضم آنزیمی الگوی PCR ۶۰۰ جفت بازی می‌باشد مشاهده گردیده است.^{۱۷} در نهایت الگوی بدون هضم ۷۵۰ جفت بازی که این عدم هضم احتمالاً به دلیل وجود جهش در ناحیه برش ژن Coa توسط آنزیم محدود کننده می‌باشد که نمونه این نوع الگوهای بدون هضم در مطالعات Güler, Yaşar Tel و همکارانشان مشاهده گردیده است.^{۱۸، ۱۹} از لحاظ وجود ارتباط بین الگوهای PCR و RFLP با محل ضایعه، پراکندگی الگوهای یاد شده در محل‌های ضایعه مختلف مشاهده گردید و این امر نشان دهنده عدم ارتباط معنادار بین محل ضایعه و الگوهای موردنظر می‌باشد که این یافته‌ها با پژوهش‌های Talebi-Satlou و همکاران همخوانی نداشت. در مطالعات آن‌ها حدود ۷۰٪ از عفونت‌های پوست و دستگاه ادراری به یک الگوی ژنتیکی خاص مربوط می‌شد که غالبیت بالای یک الگوی ژنتیکی در محل‌های ضایعه خاص را نشان می‌دهد.^{۲۰}

همچنین Tiwari و همکاران ارتباط بین الگوهای ژنتیکی به‌دست آمده را با نوع باکتری (مقاوم یا حساس به متی‌سیلین)، محل ضایعه و بخش‌های مختلف بیمارستان که نمونه‌های موردنظر از آن بخش به‌دست آمده بودند را مورد مطالعه قرار دادند و با توجه به نوع پراکندگی الگوهای به‌دست آمده در بخش‌های مختلف، روش PCR-RFLP را یک روش مناسب جهت تایپینگ مولکولی مطرح کردند.^{۲۱}

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. Javid F, Taku A, Bhat MA, Badroo GA, Mudasir M, Sofi TA. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. *Vet World* 2018;11(4):423-430.
3. Moura GS, Gebreyes WA, Marques MFS, Stipp DT, Souza FN, Da Costa LB, et al. Short communication: Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. *J Dairy Sci* 2018;101(9):7804-7807.
4. 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 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005;56(6):1000-18.
5. Gemmell CG, Edwards DI, Fraise AP, Gould FK, Ridgway GL, Warren RE; 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.
6. 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.
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. Mitani N, Koizumi A, Sano R, Masutani T, Murakawa K, Mikasa K, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP and its usefulness in an epidemiological study of an outbreak. *Jpn J Infect Dis* 2005;58(4):250-2.
9. Shi D, Higuchi W, Takano T, Saito K, Ozaki K, Takano M, et al. Bullous impetigo in children infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* alone or in combination with methicillin-susceptible *S. aureus*: analysis of genetic characteristics, including assessment of exfoliative toxin gene carriage. *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1972-4.
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. Momtaz H, Tajbakhsh E, Rahimi E, Momeni M. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and sub-clinical bovine mastitis in Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces of Iran. *Comp Clin Path* 2010;20(5):519-22.
12. Khoshkharlam-Roodmajani H, Sarvari J, Bazargani A, Kandekar-Ghahraman MR, Nazari-Alam A, Motamedifar M. Molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Shiraz teaching hospitals by PCR-RFLP of coagulase gene. *Iran J Microbiol* 2014;6(4):246-52.
13. 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.
14. Janwithayanuchit I, Ngam-Ululert S, Paungmoung P, Rangspanurath W. Epidemiologic study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by coagulase gene polymorphism. *Sci Asia* 2006;32:127-32.
15. Aslantaş Ö, Demir C, Türütöğlü H, Cantekin Z, Ergün Y, Doğruer G. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *Türk J Vet Ani Sci* 2007;31(4):253-7.
16. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Joo YS, Park YH, et al. Antibigram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2007;90(4):1716-24.
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. Yaşar Tel O, Bozkaya F. Identifying the bacteria causing ovine gangrenous mastitis and detection of *Staphylococcus aureus* in gangrenous milk by PCR. *Kafkas Univ Vet Fakültesi Dergisi* 2012;18(3):401-6.
19. Güler L, Ok U, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J Dairy Sci* 2005;88(9):3149-54.
20. 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):416-20.
21. 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.
22. Boswihi SS, Udo EE, Al-Sweih N. Shifts in the clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Kuwait Hospitals: 1992-2010. *PLoS One* 2016;11(9):e0162744.

Genetic diversity of Staphylocoagulase genes (*Coa*) among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at clinical specimens of blood and urinary infections

Mehrdad Mohammadi M.Sc.*
Jamshid Faghri Ph.D.

Department of Microbiology,
Faculty of Medicine, Isfahan
University of Medical Sciences,
Isfahan, Iran.

*Corresponding author: Department of
Microbiology, Faculty of Medicine,
Isfahan University of Medical Sciences,
Azadi Sq., Hezar Jerib St., Isfahan, Iran.
Tel: +98- 31- 37929021
E-mail:
mehrdad.mohammadi1984@gmail.com

Abstract

Received: 05 Mar. 2019 Revised: 14 Mar. 2019 Accepted: 14 Jul. 2019 Available online: 22 Jul. 2019

Background: *Staphylococcus aureus* is a common pathogen in human that can be the cause of a wide range of infectious diseases including bacteremia, pneumonia, cellulitis, and osteomyelitis and skin and soft tissue infections. The coagulase enzyme is one of the most important virulence factors of this bacterium. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) *Coa* pattern is one of the molecular base typing methods. Molecular typing plays an important role in epidemiological studies of nosocomial infection, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. The PCR-RFLP *Coa* gene technique provides a useful preliminary method to monitor variations in MRSA populations. We were done *Coa*-RFLP typing according to the method of Hookey et al., with some modifications.

Methods: In this cross-sectional study, one-hundred fifty isolates of *S. aureus* from urine and blood samples of patients that collected from educational hospitals of Imam Hossein and Al Zahra Isfahan University of Medical Sciences, Iran, from February 2018 to October 2018 were analyzed. After bacterial confirmation of isolates by *Coa* gene in polymerase chain reaction (PCR) technique, to perform coagulase gene typing, the repeated units encoding hypervariable regions of the coagulase gene of *S. aureus* were amplified by PCR. This was followed by AluI restriction enzyme digestion and analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns.

Results: Of 150 samples, 45 isolated of *S. aureus* were confirmed by biochemical methods. Of previous positive samples, 36 (80%) isolates carried *Coa* gene. Two different genotypes of *Coa* gene were obtained that include bp680 fragment in 20 specimens and bp750 fragment in 16 specimens. After enzymatic digestion by AluI restriction enzyme for RFLP, four different restriction patterns were obtained that including, the 280+400 pattern in 16 specimens (44.4%), 280+470 pattern in 7 specimens (19.4%), 340+340 pattern in 6 specimens (16.6%) and 750 patterns without digestion were in 7 specimens (19.6%).

Conclusion: Using the present experiments, it was determined that the PCR-RFLP pattern, 280+400, was the dominant pattern in the *Staphylococcus aureus* samples isolated in Isfahan.

Keywords: coagulase, cross-sectional studies, genotype, polymerase chain reaction, *staphylococcus aureus*.