Applied Biology, Volume 10, Issue 38, 2020

Study of genetic variation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens by RAPD-PCR Technique[1]

Baromand Morvaridi | MSc. Student, Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran. morvaridi321@gmail.com
Shahram Nakhjavan | Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran. shahram_nakhjavan@yahoo.com
Shahram Nanekarani | Assistant Professor, Department of Animal Science, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran. sh.nanekarani@gmail.com
Reza Yari | Assistant Professor. Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran **(Corresponding Author).** rezayari@yahoo.com

Abstract

Introduction: Methicillin Resistant-*Staphylococcus aureus* (MRSA) has been introduced as important factor in Hospital-Acquired Infections (HAI). Diversity in *Staphylococcus* strains can affect the response to treatment and identifying of strains can be effective in the selection of antibiotics. The aim of this study was to determine the genetic diversity of MRSA isolates with random primers.

Material and Methods: This cross-sectional descriptive study was performed in 2015 on 50 MRSA isolates of clinical skin samples. Genomes were extracted by Boiling method. RAPD-PCR method was performed by 16 random primers. To investigate the genetic similarity, matrix 1/0, NTSYS and MVSP software's were used. One-dimensional clustering and ordinations were conducted.

Results: The highest and lowest produced bonds related to M4 and M9 primers respectively. The greatest mean produced bands for each isolate/primer up to 8.1 relates to M4 primer. The most polymorphic bands, 36 bands belonged to M5 primer. The heaviest band, 3.6 Kb produced by M2 primer and the lightest band, 100 bp produced by M12 primer. A total of 16 primers, 583 bands formed that were 412 (70.91%) polymorphic bands and 171 (29.09%) specific bands. RAPD-PCR divided isolates into two clusters.

Conclusion: This study showed that these isolates are very heterogeneous genetically. RAPD-PCR is important in rapid detection of an epidemic outbreak, tracing the origin of the infection and the subsequent managing of infection control. Therefore, the present study tries to develop this approach and apply it in health management by providing information about the genetic diversity of MRSA.

Keywords: Methicillin Resistant-Staphylococcus aureus, Qom city, Genetic variation, RAPD-PCR.

1. **Received:** 2019/06/03 ; **Accepted:** 2020/04/26

**Copyright © the authors

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۰، شماره ۳۸، تابستان ۱۳۹۹

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جداسازی شده از نمونه‌های بالینی با روش RAPD-PCR[1]

برومند مرواریدی | دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. morvaridi321@gmail.com
شهرام نخجوان | استادیار، گروه اصلاح نباتات، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. shahram_nakhjavan@yahoo.com
شهرام ننه کرانی | استادیار، گروه علوم دامی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.sh.nanekarani@gmail.com
رضا یاری | استادیار، گروه بیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران (**نویسنده مسئول**). rezayari@yahoo.com

سابقه و هدف: استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین عامل مهم عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی است. تنوع ژنتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند بر پاسخ به درمان تأثیر بگذارد و لذا شناسایی آنها در انتخاب آنتی بیوتیک‌های کارآمد، مؤثر می‌باشد. در این مطالعه سعی شد تا تنوع ژنتیکی جدایه‌های MRSA با پرایمرهای تصادفی تعیین گردد.

مواد و روش کارها: پژوهش توصیفی- مقطعی حاضر در سال ۱۳۹۴ بر روی ۵۰ ایزوله MRSA انجام شد. ژنوم با روش Boiling استخراج گردید. تکنیک RAPD-PCR با ۱۶پرایمر انجام و قرابت ژنتیکی ایزوله‌ها با استفاده از ماتریس یک و صفر و خوشه‌بندی و رسته‌بندی با کمک نرم‌افزار NTSYS و MVSP انجام شد.

نتایج: بیشترین و کمترین باندهای تولیدی مربوط به پرایمرهای M۴ و M۹ می‌باشد. بیشترین میانگین باند برای هر ایزوله- پرایمر مربوط به پرایمر M۴ با ۸/۱ باند است. بیشترین باند پلیمرف با ۳۶ باند مربوط به پرایمر M۵ می‌باشد. بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین باندها مربوط به پرایمر M۲ با۳/۶ Kb و پرایمر M۱۲ به میزان ۱۰۰bp بود. ۱۶ آغازگر ۵۸۳ باند تشکیل دادند که ۴۱۲ (۷۰/۹۱٪) باند پلیمرف و ۱۷۱ (۲۹/۰۹٪) باند اختصاصی بود. این روش ایزوله‌ها را به دو خوشه عمده تقسیم‌بندی کرد.

نتیجه‌گیری: مطالعه نشان داد ایزوله‌ها از نظر ژنتیکی هتروژن می‌باشند. نتایج بیانگر توانایی RAPD-PCR در تمایز ایزوله‌ها است. رعایت بهداشت توسط افراد مراجعه‌کننده به مراکز درمانی و نیز استریل لوازم و وسایل مورد استفاده عمومی بیماران و مراجعان این مراکز مورد تاکید است.

کلیدواژه‌ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*، متی سیلین، قم، تنوع ژنتیکی، RAPD-PCR.

---

۱. **پژوهش حاضر برگرفته از:** پایان‌نامه کارشناسی ارشد برومند مرواریدی در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی با عنوان: **بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه‌های بالینی پوست با روش RAPD-PCR**، استاد راهنما رضا یاری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد است.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۹ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۲/۰۷

۱. مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌هایی است که باعث عفونت‌های بیمارستانی و مسمومیت غذایی شده و هر ساله صدها هزار نفر از مردم را به این بیماری مبتلا می‌کند. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بر روی غشای مخاطی و پوست پستانداران، مواد غذایی مختلف و محیط اطراف یافت می‌شود و عامل ایجاد ذات‌الریه بعد از عفونت ویروسی، ورم پستان گاو، التهاب وریدها، مننژیت، ضایعات سطحی پوست و غیره می‌باشد. *استافیلوکوکوس اورئوس* گستره وسیعی از عفونت‌ها شامل عفونت‌های ساده پوستی جوشدانه، کورک، کفگیرک، گل مژه و آبسه تا بیماری‌های تهدیدکننده زندگی مانند پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی سمی را ایجاد می‌کند (۱ ، ۲).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین[1] سویه‌های خاصی از این باکتری هستند که به بیشتر آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند. به این نوع از سویه‌ها HA-MRSA[2] یا به اصطلاح *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان می‌گویند، اما در حال حاضر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه CA-MRSA[3] در حال گسترش می‌باشند. سویه‌های CA-MRSA برخلاف HA-MRSA ارتباطی با بستری شدن در بیمارستان ندارند (۳).

از جمله روش‌های تشخیص برای این باکتری می‌توان رنگ‌آمیزی، روش‌های سرولوژی، کشت سلولی و آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی را نام برد. دو روش مولکولی مهم در طبقه‌بندی و مطالعه فیلوژنی ایزوله‌های کلینیکی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد: RAPD-PCR[4] و Ribotyping. در روش RAPD-PCR از پرایمرهای تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی برای انجام PCR استفاده می‌شود. این پرایمرها نامگذاری‌های متفاوتی دارند (۴ ، ۵). حداقل ۵۰ باند پلیمرف با استفاده از پرایمرهای تصادفی در روش RAPD-PCR لازم است تا قابلیت بررسی تنوع ژنتیکی با نرم‌افزار وجود داشته باشد. RAPD-PCR روشی مفید در مطالعات پایه و ابتدایی تاکسونومی

1. Methicillin Resistant-Staphylococcus aureus (MRSA)
2. Healthcare-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
3. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
4. *Random Amplified Polymorphic DNA*

مولکولی بویژه در آنالیز فیلوژنتیک در میان جوامع مرتبط است (۴). این روش وجود تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از منابع مختلف و مکان‌های جغرافیایی متفاوت را ثابت می‌کند (۵). RAPD-PCR توسط دانشمندان زیادی برای طبقه‌بندی *استافیلوکوکوس اورئوس* بکار رفته است (۳). این روش دارای مزیت‌هایی نسبت به سایر نشان‌گرها می‌باشد، از جمله: هزینه کمتر نسبت به سایر تکنیک‌های دیگر، نمونه‌برداری تصادفی از بسیاری از جایگاه‌های ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیفDNA جهت ساخت و طراحی پرایمر، امکان بررسی هم‌زمان چندین ژن در ژنوم نمونه‌ها، سرعت نسبتاً زیاد برای بررسی تعداد زیاد نمونه، عدم نیاز به کاوشگر و مواد رادیواکتیو، عدم نیاز به مقدار زیاد DNA الگو، امکان بررسی گونه‌های مختلف با پرایمرهای یکسان و مطالعه تعداد زیادی نمونه در مدت کوتاه‌تر نسبت به سایر روش‌ها.

با توجه به اینکه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یک پاتوژن شایع عفونت‌های بیمارستانی و پوستی است، از این‌رو تشخیص وجود یا عدم وجود تنوع ژنتیکی در جدایه‌های این باکتری در مراکز جمع‌آوری، بیمارستان‌ها و مسافران کمک شایانی به شناسایی فراوانی انواع جدایه‌ها در مقایسه با سوش‌های استاندارد، مدیریت کنترل آلودگی‌ها، اپیدمیولوژی باکتری و درمان بیماری‌های حاصل از آن خواهد کرد.

هدف مطالعه حاضر ارزیابی وجود یا عدم وجود تنوع ژنتیکی بین ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداسازی شده در مطالعات قبلی از نمونه‌های بالینی پوست با روش RAPD-PCR و با کمک نرم‌افزارهای فیلوژنی بود.

۲. روش کار

پژوهش حاضر یک مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های مقاوم به متی سیلین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است. حجم نمونه‌ها با کمک فرمول کوچران در جمعیت مورد مطالعه ارزیابی و محاسبه شد.

جمع‌آوری نمونه‌ها: پس از جمع‌آوری ۱۶۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* و انجام تست‌های تاییدی و PCR ژن مقاومت به متی سیلین(*mecA*) جهت شناسایی ایزوله‌های $MRSA^{+}$، تعداد ۵۰ ایزوله MRSA شناسایی و برای ادامه مطالعه انتخاب شد (۶).

آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی: باکتری‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه مجدداً با رنگ‌آمیزی گرم، ویژگی‌های فنوتیپی کشت، آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی نظیر تست کوآگولاز، MSA،

DNase، همولیز، کاتالاز، اکسیداز و مولکولی srRNA ۱۶ تعیین هویت گردیدند. ایزوله‌های تایید شده برای آزمایشات بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین *Staphylococcus aureus* subsp. Aureus COL در کلیه بخش‌های مطالعه استفاده شد.

استخراج DNA و تعیین کیفیت و کمیت آن: استخراج DNA با روش تغییر یافته Boiling انجام شد. DNA استخراج شده جهت انجام مراحل بعدی در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. با دو روش اسپکتروفتومتری جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و ژل الکتروفورز در آگارز ۰/۷% غلظت و خلوص DNA استخراج شده بررسی شد.

توالی پرایمرها و واکنش PCR: PCR با تکنیک RAPD-PCR انجام و ژل الکتروفورز بر روی آگارز ۱/۷ درصد انجام شد. در تحقیق حاضر از پرایمرهای جدول ۱، خریداری شده از شرکت سیناکلون استفاده گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه

منابع	توالی پرایمر از '۵ به '۳	نام پرایمر	توالی پرایمر از '۵ به '۳	نام پرایمر
۵-۱	5'-CAGCACCCAC-3'	M9	5'-GCGATCCCCA-3'	M1
	5'-ACGATGAGCC-3'	M10	5'-GTGGATGCGA-3'	M2
	5'-AGTCAGCCAC-3'	M11	5'-TGACCCGCCT-3'	M3
	5'-GGTCCCTGAC-3'	M12	5'-GAGGGAAGAG-3'	M4
	5'-AGGGAACGAG-3'	M13	5'-AGGGGTCTTG-3'	M5
	5'-GGGTAACGCC-3'	M14	5'-AGCGTCACTG-3'	M6
	5'-ACCGCCTGCT-3'	M15	5'-TCACGATGCA-3'	M7
	5'-GGACTGGAGT-3'	M16	5'-AATCGGGCTG-3'	M8

PCR با استفاده از DNA استخراج شده، پرایمر، Master mix و آب مقطر استریل در حجم ۲۵ میکرولیتر و با شرایط دمایی- زمانی ثابت برای همه پرایمرها (جدول۲) انجام شد.

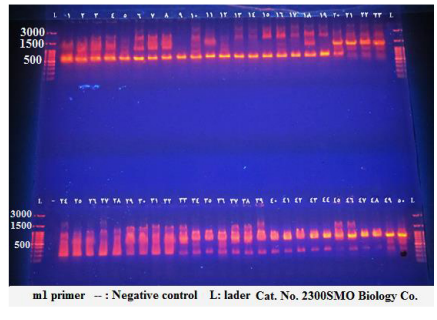
جدول ۲- برنامه PCR جهت تکثیر امپلیکون‌ها

چرخه	زمان	دما (°C)	مرحله
۱	۵ min	۹۴	دناتوراسیون اولیه
۳۰	۶۰ Sec	۹۴	دناتوراسیون در چرخه
	۳۰ Sec	۳۶	اتصال پرایمر
	۶۰ Sec	۷۲	پلیمریزاسیون
۱	۵ min	۷۲	پلیمریزاسیون نهایی

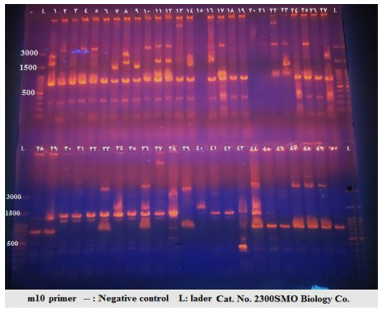
ژل الکتروفورز و آنالیز داده‌ها: پس از اتمام الکتروفورز از باندها عکس گرفته شد. اندازه باندها بررسی گردید. اندازه باندها با توجه به اندازه باندهای مارکر DNA و به کمک نرم‌افزار Band Leader 3.0 به دقت بررسی، تایید و ثبت شدند. داده‌های ژل الکتروفورز به صورت ماتریس ۰/۱ وارد SPSS شدند. از نرم‌افزارهای NTSYSpc[1] وMVSP[2] جهت ترسیم دندروگرام UPGMA[3] و NJ[4] و رسته‌بندی‌های PCA و PCoA[5] با استفاده از ضرایب مختلف نظیر Jaccard استفاده گردید. اعتبارسنجی با کمک نرم‌افزار Win Boo و روش Bootstraping انجام شد.

۳. یافته‌ها

با توجه به الگوی RAPD از هر ۱۶ پرایمر مورد استفاده بیشترین باند تولیدی مربوط به پرایمرM4 با ۴۰۵ باند برای ۵۰ ایزوله و کمترین باند تولیدی مربوط به پرایمر M9 با ۱/۰۴ باند برای ۵۰ ایزوله می‌باشد و نیز بیشترین میانگین باند برای هر ایزوله-پرایمر مربوط به پرایمر M4 با ۸/۱ باند است. بیشترین باند پلیمرف با ۳۶ باند مربوط به پرایمر M5 می‌باشد. بزرگ‌ترین باند مربوط به پرایمر M2 با ۳/۶ Kb یا ۳۶۰۰bp و کوچک‌ترین باند مربوط به پرایمر M12 به میزان ۱۰۰bp است. در تصویر ۱ نتیجه PCR ۵۰ ایزوله با دو پرایمر M1 و M10 نشان داده شده است (تصویر سایر ژل‌ها ارائه نشده است).



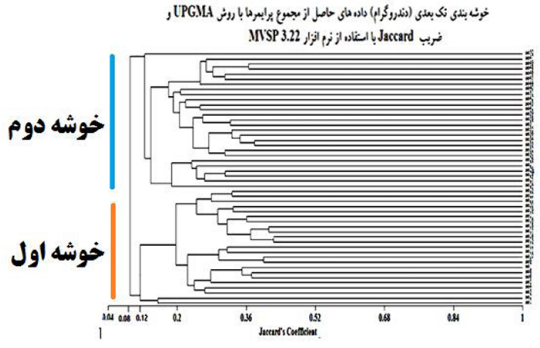
شکل ۱ الف- ژل الکتروفورز PCR پرایمر M1



شکل ۱ ب- ژل الکتروفورز PCR پرایمرM10

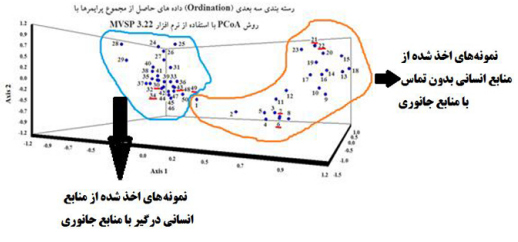
1. Numerical Taxonomy System
2. Multi Variate Statistical Package
3. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
4. Neighbor Joining
5. Principal Coordinate Analysis

در خوشه‌بندی (Clustering) تک بعدی با روش UPGMA در فاصله ۰/۰۸ دو خوشه اصلی و در فاصله ۰/۱۲ چهار خوشه کوچک‌تر تشکیل شده که حاکی از تنوع ژنتیکی بالای ایزوله‌های مورد مطالعه است (شکل ۲).



شکل۲- خوشه‌بندی تک بعدی با روش UPGMA و ضریب Jaccard

همانطور که در رسته‌بندی سه بعدی مشاهده می‌شود، ایزوله‌ها دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند و در دو خوشه مجزا (دو محدوده قرمز و آبی) قرار گرفتند که همان دو خوشه حاصل از خوشه‌بندی تک بعدی شکل ۲ می‌باشد (شکل۳).



شکل۳- رسته‌بندی(Ordination) سه بعدی ۵۰ ایزوله MRSA با روش PCoA

براساس الگوی ماتریس تشابه، بیشترین تشابه بین ایزوله‌های ۱۳ و ۱۴ به میزان ۰/۵۴۳ و کمترین تشابه بین ایزوله‌های ۱ و ۴۷ به میزان ۰/۰۰۷ محاسبه گردید.

٤. بحث

این بررسی برای نخستین بار روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های

بالینی بیمارستان‌های شهر قم انجام شده و نشان داد ایزوله‌ها از نظر ژنتیکی بسیار هتروژن می‌باشند. همچنین نتایج بیانگر توانایی RAPD-PCR در تمایزدهی ایزوله‌ها است. در مطالعه حاضر با توجه به روش آنالیز داده‌ها و نوع پرایمرهای بکار رفته، هیچ ارتباط معنی‌داری در سطح $p<0.05$ بین ایزوله‌ها و بیمارستان‌های محل جداسازی، جنسیت و سن مشاهده نشد که حاکی از گسترش ایزوله‌ها در ۳ بیمارستان مورد بررسی و یا از خارج به داخل بیمارستان‌ها با الگوی پراکنش از منابع مختلف است.

روش RAPD-PCR توسط محققان متعددی جهت طبقه‌بندی و مطالعات اپیدمیولوژیک استفاده شده است (۷- ۱۱). در مطالعه Kurlenda و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ۲۳۴ ایزوله MRSA جداسازی شده از یک بیمارستان با کمک روش RAPD-PCR ۱۰ گروه ایجاد شد و هیچ ارتباطی بین ایزوله‌ها و بخش‌ها و نوع آلودگی بالینی یافت نشد که حاکی از گسترش آسان ایزوله‌ها در جامعه، بیمارستان‌ها، کارکنان و بیماران است (۳). این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد. در آن مطالعه تنها از یک پرایمر (AP-07) استفاده شد، ولی در تحقیق حاضر از ۱۶ پرایمر بر روی نمونه‌های ۳ بیمارستان مطالعه انجام شد. در مطالعه Idil در سال ۲۰۱۴ از ۱۰ پرایمر تصادفی RAPD بر روی ۴۹ ایزوله MRSA جدا شده از ۳ بیمارستان شهرهای مختلف ترکیه استفاده شد. نتایج با برنامه NTSYS-pc با روش UPGMA آنالیز گردیدند. در این مطالعه قطعاتی بین ۲۰۰ تا ۱۵۰۰bp تولید شدند (۱۲) که با طول قطعات حاصله در این مطالعه متفاوت بود (۱۰۰bp تا ۳۶۰۰bp).

در سال ۲۰۰۴ Reinoso و همکاران ۸۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از انسان و گاو را با روش RAPD-PCR مطالعه کردند. ۵۲% ایزوله‌ها متعلق به یک بیوتایپ خاص (انسان، گاو و یا ماکیان) بودند. ایزوله‌های موجود در گاو و انسان شیوع بیشتری داشتند. دندروگرام حاکی از وجود ۸ خوشه (A-K) براساس شباهت ژنتیکی با کمک ۳ پرایمر تصادفی بود. خوشه A شامل ۹۵% ایزوله‌های جدا شده از میزبان انسانی بود و سایر خوشه‌ها (B-K) از منابع گاوی جدا شده بودند. PCoA نشان داد که ایزوله‌ها می‌توانند به دو گروه با منشاء گاوی و انسانی تقسیم شوند. تنها ۹% ایزوله‌ها بر این اساس خارج از این دو گروه قرار گرفتند. تنوع ژنتیکی ایزوله‌های جدا شده از منابع گاوی نسبتاً کمتر از منابع انسانی بود. مطالعه نشان داد که این روش با کمک سه پرایمر به خوبی توانسته رابطه ژنتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از منابع متفاوت را طبقه‌بندی

نماید (۱۱). حکیمی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از منابع غذایی، گاوی و انسانی با روش RAPD-PCR پژوهشی را انجام دادند. از ۲۰۸ ایزوله، مجموعاً ۵۷ باند پلیمرف ایجاد شد. بر این اساس همه نمونه‌ها در ۹ خوشه شامل A تا I با شباهت بالای ۸۰% قرار گرفتند. برخی از خوشه‌ها دارای تنها ایزوله‌های حاصل از یک منبع بودند، مانند خوشه‌های A، B، C، E و H، اما سایر خوشه‌ها شامل D، F، G و I شامل ایزوله‌های حاصل از منابع متفاوت بودند. نتایج نشان داد که برخی ایزوله‌ها به ویژه ایزوله‌های MRSA بین منابع مختلف درگذر هستند و لذا موضوعات بهداشتی در شکستن این زنجیره انتقال باید کاملاً رعایت شود (۱۴). در مطالعه حاضر نیز که با استفاده از ۱۶ پرایمر روی ۵۰ ایزوله MRSA انجام شد، دو خوشه در دندروگرام مشاهده شد که گروه اول بیشتر شامل نمونه‌های انسانی و گروه دوم بیشتر شامل نمونه‌های انسانی درگیر با پرورش، نگهداری، فروش و یا کشتار ماکیان، گاو و گوسفند می‌باشد.

تنوع موجود در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منابع متفاوت می‌تواند پاسخ به درمان را تحت‌الشعاع قرار دهد و شناسایی این تنوع می‌تواند در نحوه انتخاب آنتی بیوتیک موثر باشد (۱۳).

۵. نتیجه‌گیری

۵۰ ایزوله MRSA از منابع متنوعی در بین نمونه‌های انسانی پراکنده شده‌اند که می‌تواند شامل ملحفه، پتو، سیستم بهداشتی، تهویه، انتقال انسان به انسان، انتقال حیوان به انسان، وسایل و تجهیزات درمانی باشد. این امر ضرورت رعایت بهداشت فردی و عمومی توسط افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان و پرسنل درمانی را مورد تاکید قرار می‌دهد. به منظور حذف ایزوله‌های MRSA نیاز به برنامه کنترل عفونت برای شناسایی و ایزولاسیون بیماران $MRSA^{+}$ و کلونیزاسیون و درمان پزشکی کارکنان می‌باشد. همچنین نیاز به برنامه آموزشی در همه بیمارستان‌ها و تغییر سیاست آنتی بیوتیک درمانی جهت حذف ایزوله‌های MRSA می‌باشد. استفاده از سفالوسپورین‌های نسل ۳ و ۴ و نیز کاربانم‌ها باید محدود به نتایج آنتی‌بیوگرام شود. باید از پماد موپیروسین برای ناقلین MRSA استفاده کرد و در بیماران مقاوم به موپیروسین ایزولاسیون و رعایت نکات بهداشتی شدید مدنظر باشند. برای محدودسازی گسترش MRSA بیماران مربوطه باید از بیمارستان تخلیه شوند. نتایج مطالعه حاضر و چند مطالعه دیگر نشان داد که تهیه نقشه آنتی‌بیوگرام نقش مهمی در درمان آنتی بیوتیکی دارد و تهیه الگوی RAPD در مطالعات اپیدمیولوژیک مهم است. در مرحله بعد

جهت تمایز بیشتر ایزوله‌های MRSA می‌توان از روش‌هایی نظیر RFLP[1] و PFGE[2] استفاده کرد (۳، ۱۳، ۱۵).

٦. تشکر و قدردانی

از مسئولان آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی سلولی و مولکولی بروجرد که در انجام پژوهش حاضر، حمایت کردند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

1. Restriction Fragment Length Polymorphism
2. Pulsed-Field Gel Electrophoresis

References

1. Nowroozi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. Isolation and Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A-E and TSST-1 Genes from Different Sources by PCR Method. *J Qom Uni Med Sci*. 2012; 6(3): 78-85. [In Persian]
2. Gadyari F, Sattari M, Boroumand M, Yaghoubi R, Sepehriseresht S, Purgholi L. Detection of *Staphylococcus aureus* Entrotoxins A to D in clinical strains isolated from burned patients of Tehran Motahari Hospital. *J Iran Med Sci*. 2011; 5(5): 20-27. [In Persian]
3. Kurlenda J, Grinholc M, Jasek K, Wegrzyn G. RAPD typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A 7-year experience in a Polish hospital. *Diagn Med Tecnol*. 2007; 13(6): 13-18.
4. Pereira MSV, Leal NC, Leal TCA, Sobreira M, de Almeida AMP, Siqueira-Junior JP, Campos-Takaki GM. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. *Lett Appl Microbiol*. 2002; 35: 32–36.
5. Naffa RG, Bdour SM, Migdadi HM, Shehabi AA. Enterotoxicity and genetic variation among clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Jordan. *J Med Microbiol*. 2006; 55(2): 183–187.
6. Yari R, Mehrabi MR, Gorbanpoor AmirKiasari N. Detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Strains by Comparing Oxacillin and Cefoxitin Disk Diffusion and PCR for *mecA* Gene. *Appl Biol*. 2016; 6(3): 40-50. [In Persian]
7. Andrasevic AT, Power EG, Anthony RM, et al. Failure of bacteriophage typing to detect an inter-hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Zagreb subsequently identifi ed by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). *Clin Microbiol Infect*. 1999; 10: 634–642.
8. Blanc DS, Francioli P, Hauser PM. Poor value of Pulsed-Field Gel Electrophoresis to investigate long-term scale epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*, 2002; 2(2): 145–148.
9. Telecco S, Barbarini D, Carretto E, Comincini S, Emmi V, Marone P. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from an intensive care unit by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *New Microbiol*, 1999; 22(4): 323–329.
10. Al-Thawadi SI, Kessie G, Dela Cruz D, Al-Ahdal MN. A comparative study on the application of 3 molecular methods in epidemiological typing of bacterial isolates using MRSA as a prototype. *Saudi Med J*, 2003; 24(12): 1317–1324.
11. Reinoso E, Bettera S, Frigerio C, Direnzo M, Calzolari A, Bogni C. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiol Res*. 2004; 1(59): 245–255.
12. Idil N, Bilkay IS. Application of RAPD-PCR for determining the clonality of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different hospitals. Braz. *Arch. Biol. Technol*. 2014; 57(4): 548-553.

13. Deplano A, Vaneechoutte M, Verschraegen G, Struelens MJ. Typing of Staphylococcus strains by PCR analysis of inter Is256 spacer length polymerase. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(10): 2580-2587.
14. Hakimi Alni R, Mohammadzadeh A, Mahmmodi P, Alikhani Y. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different sources. *Comp Clin Pathol*. 2017; 26(4): 823-830.
15. Byun DE, Kim SH, Shin JH, Suh SP, Ryang DW. Molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *J Korean Med Sci*. 1997; 12(3): 190-198.

استناد به این مقاله:

مرواریدی، برومند؛ نخجوان، شهرام؛ ننه‌کرانی، شهرام؛ یاری، رضا (۱۳۹۹). بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جداسازی‌شده از نمونه‌های بالینی با روش RAPD-PCR. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۰، شماره ۳۸، ص ۳۵-۴۶.