

ژنوتیپینگ استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی جدا شده از نمونه‌های

کلینیکی با استفاده از ژن *tuf* با تکنیک PCR-Sequencing

افشین اژدری^۱، سعید تمدنی جهرمی^{۱*}، صدیقه جوادی پور^۲، امیراقبال خواجهرحیمی^۳، مریم طلا^۴، مریم انصاری^۵

چکیده

بیش از دو دهه از پیدایش استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی به عنوان پاتوژن‌های فرصت طلب بخصوص در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و بیماران دارای ایمپلنت می‌گذرد. بروز فزاینده عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری‌ها شناسایی آنها را در حد گونه مطرح می‌سازد. هدف از انجام این مطالعه شناسایی سویه‌های استافیلوکوک کواگولاز منفی جداسازی شده از ۵۰ نمونه کلینیکی به روش‌های فنوتیپی و

سکانسینگ ژن *tuf* بود.

تعداد ۵۰ نمونه استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی از نمونه‌های مختلف بالینی بیمارستان شهید محمدی بندرعباس جداسازی شد. روش‌های فنوتیپی شامل آزمون‌های بیوشیمیایی و روش‌های ژنوتیپی سکونسینگ ژن *tuf* به کار گرفته شد. سپس بلاست و رسم درخت فیلوژنیک انجام شد.

سویه‌هایی که از نمونه‌های بالینی جداسازی شدند شامل ۲۵ (۵۰٪) استافیلوکوک اپیدرمیدیس، ۲۲ (۴۴٪) استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و ۳ (۶٪) استافیلوکوک هموفیتیکوس بودند. اغلب سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس از نمونه‌های خون و ادرار جداسازی شدند. وانکومایسین به عنوان موثرترین آنتی بیوتیک و سپس سفالکسین و افلوکساسیلین آنتی بیوتیک‌های موثر بودند. بعد از بلاستینگ سویه‌های رفرانس و ردیف نمودن آنها با ۸ نمونه سکانس شده، درخت فیلوژنیک با روش Neighbor joining رسم شد. ۵۰ سویه دارای ۱۰۰٪ قرابت نوکلئوتیدی با S. epidermidis strain SeMcV45 و ۳ سویه دارای ۹۹٪ قرابت با S. haemolyticus strain ShMVCV14 بودند.

استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی طیف وسیعی از عفونت‌های بیمارستانی را ایجاد می‌کنند. PCR-Sequencing ژن *tuf* روش مناسب و مطمئنی برای شناسایی سویه‌های استافیلوکوک کواگولاز منفی در مطالعات اپیدمیولوژیک است.

واژگان کلیدی: ژن *tuf* استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی، نمونه‌های بالینی

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۹۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۲۰

مقدمه

استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی در تمامی اعضاء باز بدن ساکن هستند. درگذشته به عنوان عوامل غیر پاتوژن یا بیماری‌زای

ضعیف و عوامل آلوده کننده ثانویه قلمداد می‌شده‌اند. شایع‌ترین پاتوژن‌هایی هستند که باعث عفونت کاتترهای وریدی، پیوندها و شنت‌های همودیالیز، کاتترهای دیالیز صفاقی، مفاصل مصنوعی، پیوندهای عروقی و درجه‌های مصنوعی می‌شوند. این باکتری‌ها دارای گستردگی وسیعی در طبیعت بوده و جزء باکتری‌های بیماری‌زای فرصت طلب قلمداد می‌گردند. حدود ۷۵-۵۵٪ عفونت‌های بیمارستانی توسط آنها ایجاد می‌گردد.

با توجه به تنوع و گستردگی سویه‌ها و وجود عوامل بیماری‌زای هزینه‌های بالایی جهت جداسازی، تشخیص و درمان آنها صرف می‌شود. تولید بیوفیلم در سطوح پلیمری از جمله مشکلات عدیده ناشی از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی است با وجود این ماده ترش‌ساز باکتری‌ها از استرس‌های ناشی از مواد شیمیایی، بیولوژیک و آنتی بیوتیک‌ها محافظت می‌گردند. بالاترین میزان عود در سویه‌های تولید کننده بیوفیلم (اسلایم مثبت) و کمترین میزان عود مربوط به سویه‌های (اسلایم منفی)

می‌باشد. سیستم کوئورم سنسینگ دارای یکسری ژن‌هایی مانند ژن *AtLE*, *AI2*, *Luxs*, *Agr* بوده که این سیستم عفونت ناشی از استافیلوکوک‌ها را تحت کنترل دارد. طی مطالعه (Seen vasan) در سال ۲۰۰۳ استافیلوکوک لوگدنسیس باعث ایجاد آندوکاردیت در مصرف‌کنندگان کوکائین می‌گردد.

بیماری‌های عفونی طیف وسیعی از بیماری‌ها را شامل می‌شوند که بیماری‌های باکتریایی، ویروسی، انگلی و قارچی از آن جمله هستند. بروز بیماری‌های مهم از جمله ایدز و اهمیت تشخیص

* مؤسسه تحقیقات علوم شیلات کشور، پژوهشگاه اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، هرمزگان، ایران. stamadoni@yahoo.com

۲- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی، هرمزگان، ایران.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۴- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قشم، قشم، ایران.

۵- بیمارستان شهید محمدی بندرعباس، هرمزگان، ایران.

چیدمان مخصوص و منحصر به فرد می‌باشد. کوچکی اندازه، محافظت شده بودن این ژن در ژنوم باکتری‌ها بر اهمیت این ژن می‌افزاید، علاوه بر این (EF-TU (elongatingfactor-Tu) Elonging-factor TU توسط این ژن کد می‌شود که مسئول افزایش طویل‌سازی پروتئین‌هاست.

درارتباط با میزان فراوانی استافیلوکوک‌های شایع در بیمارستان بیشترین میزان فراوانی مربوط به استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس است. در مطالعه Delgado و همکاران (۲۰۰۷) که در کشور اسپانیا انجام گردید، از بین ۳۰۰ نمونه ۲۷۰ نمونه (۹۰٪) بیماران مبتلا به ماستیدیس در اثر استافیلوکوک اپیدرمیدیس بوده است (۳).

در مطالعه Pasqual (۲۰۰۹) در کشور برزیل در بیماران مبتلا به پریونیت از ۵٪ مبتلایان سویه‌های مختلف استافیلوکوک کواگولاز منفی جداسازی گردید که به ترتیب استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۲۴٪ استافیلوکوک همولیتیکوس ۱۱٪ و سایر سویه‌ها با اهمیت کمتر در مرتبه بعدی قرار داشته‌اند (۷).

بیشترین میزان بیماری‌ها بخصوص عفونت‌های دریچه قلب مصنوعی، اجزاء، لوازم و سوندها، توسط استافیلوکوک اپیدرمیدیس بروز پیدا می‌کند به دلیل بیماری‌زایی و به خصوص مشکلاتی که در کاترها و ایمپلنت‌ها ایجاد می‌گردد و

با توجه به بروز مشکلات ناشی از مقاومت آنتی بیوتیکی شناسایی و بررسی فراوانی این دسته از باکتری‌ها در نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان شهید محمدی شهرستان بندر عباس مورد توجه قرار گرفت.

از آنجا که در چند سال اخیر اهمیت بیماری‌زایی باکتری‌های گروه استافیلوکوک کواگولاز منفی مشخص گردیده است، لذا در این تحقیق، هدف، بررسی بیماری‌زایی و جداسازی استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی می‌باشد، لذا اقدام به جداسازی این دسته از باکتری‌ها به روش‌های فنوتایپینگ و ملکولی گردید.

و پایش بیماران ضرورت بکارگیری روش‌های نوین مولکولی را به دلیل مقاومت به دارو، فرار از دسترس سیستم ایمنی و غیر قابل تشخیص بودن با روش‌های رایج صد چندان می‌نماید. با توجه به جهش‌های ملکولی و تغییرات مختلف در ژنوتیپ اکثر باکتری‌ها و ایجاد مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و انتقال این تغییرات ژنتیکی و به تبع آن تولید سویه‌های مقاومتر به آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله دلایلی اند که لزوم بکارگیری روش‌های مولکولی را به عنوان ابزار مفید پزشکی به منظور دسترسی به تشخیص صحیح و کاهش هزینه درمان برای سیستم بهداشتی و درمانی (به منظور ارتقای سطح سلامت و بهداشت) را خاطر نشان می‌سازند. همچنین می‌توان از روش‌های فوق به عنوان آزمون تشخیصی و روش پیگیری درمان استفاده کرد و با تجزیه و تحلیل تفاوت ژنومی زیر گونه یا سویه میکروارگانیسم درک بهتری از فعالیت بیوشیمیایی و بیماری‌زایی آنها بدست آورد.

قبلاً محط کشت افتراقی بهترین روش شناسایی و ردیابی باکتری‌ها بودند سپس آزمون بیوشیمیایی و سرولوژیک نقش عمده‌ای عهده‌دار شده. اولین بار پس از کشف بخش ثابت اوپران در RNA ریبوزومی استفاده از نشانگرهای مولکولی یا پروب در میکروبی شناسی آغاز شد. مثلاً تشخیص منفرد باکتریایی با استفاده از توالی یابی ژن srRNA ۱۶ در نمونه مایع مغزی نخاعی با روش PCR حائز اهمیت است. همچنین روش‌های معمول مانند کشت در تشخیص و ردیابی برخی باکتری‌ها از جمله استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی بسیار وقت گیر هستند. امروزه استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی در اکثریت نمونه‌های بالینی وجود داشته که امکان بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را دو چندان می‌سازد که استفاده از روش‌های ملکولی در تشخیص زود هنگام و درمان به موقع کاربرد ویژه‌ای دارد.

ژن *tuf* به صورت یک مجموعه بر روی اپرون STR کروموزوم باکتری واقع است و هر سویه از باکتری‌ها دارای

مواد و روش کار

این مطالعه در طی سال‌های ۹۰-۸۹ در بخش‌های مختلف بیمارستان شهید محمدی بندرعباس انجام شد. افراد مورد پژوهش بیماران بستری در بخش‌های مختلف بودند. حجم نمونه توسط فرمول کوکران محاسبه شد (۸). تمامی محیط کشت مورد استفاده که شامل محیط کشت فسفاتاز، فیل فتالین دی فسفات، اوره، مانیتول، تریپتوز سوی براث، نوترینت آگار بودند، که از شرکت سیناژن فراهم شد. تعداد ۵۰ نمونه به صورت تصادفی از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان شامل نمونه‌های کشت خون (۲۱ نمونه)، ادرار (۱ نمونه)، ترشحات چشم (۱ نمونه)، تراشه (۳ نمونه)، عفونت زخم (۷ نمونه)، پریتونئال (۲ نمونه)، مایع پلورال (۵ نمونه)، خلط (۱ نمونه)، آسیت (۲ نمونه)، CSF (مایع مغزی نخاعی) (۱ نمونه)، DPL (نمونه بیماران دیالیزی) (۱ نمونه)، توسط سوآپ اخذ و به محیط تریپتوز سوی براث منتقل و در شرایط مناسب بلافاصله به آزمایشگاه ارسال و بر روی محیط‌های دی ان از، بلاد آگار و نوترینت آگار کشت داده شد (جدول ۱). این باکتری‌ها با استفاده از کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی و سپس جهت انجام آزمون‌های افتراقی و جداسازی استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی از استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت با استفاده از تست‌های اوره آز، تخمیر قند مانیتول، تست فسفاتاز (محیط فسفاتاز آگار)، حساسیت به نوویوسین و پلی میکسین B که برای این تست غلظت نیم مک فارلند از سوسپانسیون باکتری تهیه شد و به محیط مولر هیتون حاوی هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها تلقیح و نتایج بررسی و خصوصیات کلنی، سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، از سایر استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی جداسازی شدند.

روند آزمایشات و جداسازی سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس در ابتدا

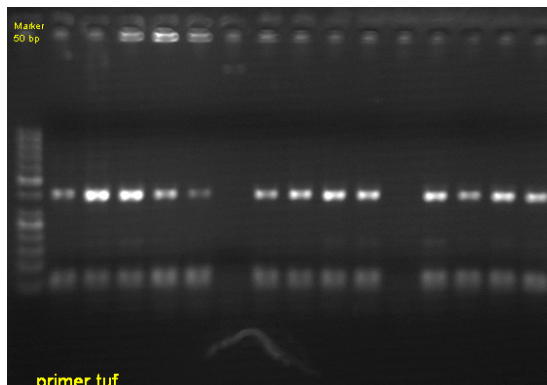
استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت از کوآگولاز منفی جداسازی شدند. که بدین منظور ابتدا اقدام به نمونه‌برداری و کشت بر روی محیط‌های دی ان از و بلاد آگار و نوترینت آگار و سایر محیط‌های اختصاصی برای جداسازی استافیلوکوک‌ها گردید. بعد از رشد باکتری‌ها با استفاده از روش لوله‌ای تست کوآگولاز اقدام به جداسازی استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت از کوآگولاز منفی گردید. بدین منظور کلنی باکتری را وارد لوله‌های حاوی پلاسما انسانی (سرم حاوی هپارین) که قبلاً آماده شده بود، نموده و به مدت ۶ ساعت انکوبه گردید، که هر کدام از نمونه‌ها که حاوی لخته بودند کوآگولاز مثبت تشخیص داده شد و از بین نمونه‌ها حذف گردید و سایر نمونه‌ها کوآگولاز منفی تلقی و جهت آزمایشات تکمیلی مورد بررسی قرار گرفتند.

سپس آزمون‌های ذیل جهت جداسازی دو سویه ذکر شده استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس از سایر کوآگولاز منفی‌ها انجام گردید به طوری که از همه نمونه‌ها بر روی محیط اوره آگار و مانیتول آگار کشت داده شد. جهت تشخیص تفریقی از تست‌های اوره، مانیتول، تست حساسیت به نوویوسین و آزمون فسفاتاز استفاده گردید.

جهت شناسایی سویه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس علاوه بر تست‌های اوره از و مانیتول و سایر تست‌ها از تست حساسیت به پلی میکسین استفاده گردید که بدلیل حساسیت به پلی میکسین B این سویه همانند استافیلوکوک اپیدرمیدیس جداسازی و شناسایی شد.

استخراج DNA به روش‌های استفاده از کیت (کیاژن) و روش‌های دیگر مانند قرار دادن کلنی‌های تازه باکتری در حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در بافر لیزین و هیدروکسید سدیم انجام شد.

الکتروفورگرام های تکمی تصحیح شده و توالی ها با استفاده از نرم افزار 1.5c clausal با تنظیم دستی هم عرض شدند. توالی های بدست آمده نتایجی که از مقایسه بین این توالی ها با توالی های ژن *tuf* موجود از گونه های مهم بیماری زا حاصل شده بود را تأیید کرد در این تحقیق از توالی های DNA دیگر گرفته شده از بانک جهانی ژن (NCBI) برای مقایسه و تراز کردن توالی ها استفاده شد (نگاره ۳). از نرم افزار MEGA 4 برای محاسبه فاصله ژنتیکی و رسم درخت فیلوژنی که میزان قرابت گونه های مورد نظر را بر اساس مدل Kimura 2-parameter ترسیم می نماید، استفاده گردید (۵).



نگاره ۱- محصول PCR با استفاده از پرایمر های ژن *Tuf*

PCR و تعیین توالی DNA

واکنش زنجیره پلیمرار با استفاده از یک جفت *set primer* اختصاصی ژن *tuf* برگرفته از بانک جهانی ژن انجام شد. واکنش PCR در ۵۰ ماکرولیتر محلول واکنش استاندارد انجام شد که شامل موارد زیر بود. ۲ میکرولیتر DNA ژنومی ۱ pmol از هر پرایمر (۵'-GCCAGTTGAGGACGTATTCT-3'; R: CATTTCAGTACCTTCTGGATT3') و $MgCl_2$ (از ۱/۵ تا ۳ چک شد)، ۲mm dNTP و ۵ واحد آنزیم *Taq DNA* پلیمراز (۱۰۰ UN) که تکثیر ژن مورد نظر در دستگاه ترموسایکر PTC-200 انجام شد. سیکل حرارتی مورد استفاده در دستگاه PCR شامل یک پیش چرخه واسرشته کننده با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشته کردن اولیه DNA مورد نظر، بدنبال آن ۳۰ چرخه ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد (Denaturation)، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمرها به DNA الگو (Annealing)، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت بسط و تکثیر (Extention) و یک دوره ۱۰ دقیقه ای بسط و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد (نگاره ۱) محصول PCR با استفاده از کیت (ROCH) خالص سازی و نمونه ها برای تعیین توالی ارسال گردید.

اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از شاخص های آمار توصیفی مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. جهت بررسی الگوی حساسیت باکتری ها به آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده در بیمارستان تست آنتی بیوگرام انجام شد. پس از جمع آوری اطلاعات در ارتباط با مصرف آنتی بیوتیک و حساسیت و مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف میزان حساسیت هر سویه نسبت به هر آنتی بیوتیک خاص توسط نرم افزار SPSS16 مورد تجزیه و تحلیل دقیق قرار گرفت.

نتایج

از ۵۰ نمونه، باکتری هایی که به روش های فنوتیپینگ و بیوشیمیائی شناسائی شدند، ۲۵ نمونه (۵۰٪) استافیلوکوک اپیدرمیدیس، ۲۲ نمونه (۴۴٪) استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و ۳ نمونه (۶٪) سایر سویه ها استافیلوکوک کواگولاز منفی بودند که در جدول ۱ شرح داده شده است. از آنجا که نمونه ها از افراد با بیماری های مختلف و در فصول متفاوت مورد آزمایش قرار گرفت، هیچ تفاوت معنی داری نسبت به فصول متفاوت و سن و جنس بیماران در بروز بیماری های ناشی از استافیلوکوک های کواگولاز منفی مشاهده نگردید.

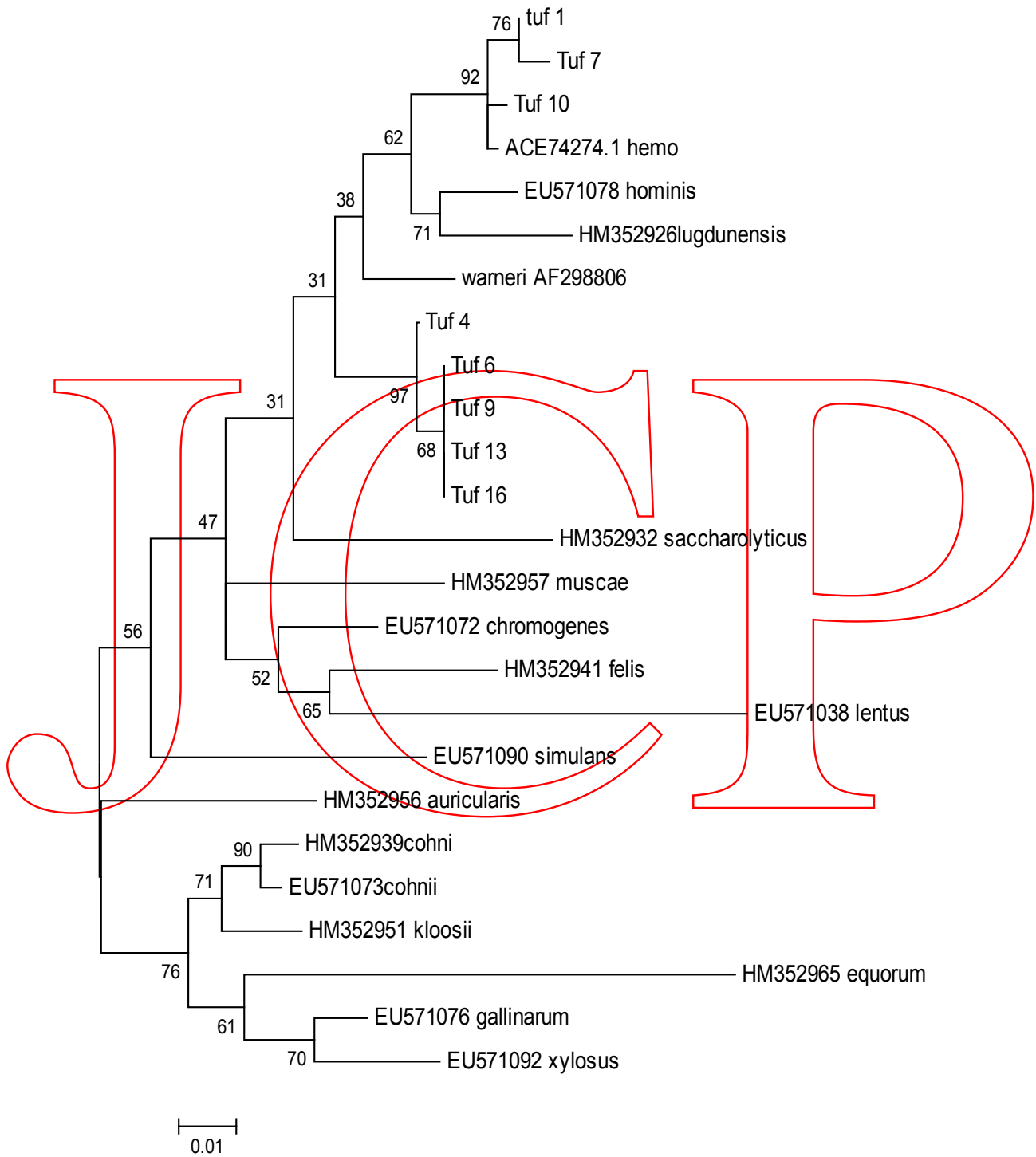
رسم درخت فیلوژنیک

جدول ۱- فراوانی استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی بر حسب نوع نمونه

نمونه	تعداد نمونه	درصد فراوانی نسبی	فراوانی استافیلوکوک همولیتیکوس	درصد فراوانی نسبی	فراوانی استافیلوکوک ساپروفیتیکوس	درصد فراوانی نسبی	فراوانی استافیلوکوک اپیدرمیدیس
کشت خون	۲۱	۵/۵	۱	۲۸/۵	۶	۶۶/۶	۱۴
کشت ادرار	۶	۰	۰	۶۶	۴	۳۳	۲
مایع پلور	۵	۲۰	۱	۶۰	۳	۲۰	۱
کشت زخم	۷	۰	۰	۲۸	۴	۷۲	۳
آسیت	۲	۰	۰	۵۰	۱	۵۰	۱
DPL	۱	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱
CSF	۱	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰
خلط	۱	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱
پرنئونال	۲	۰	۰	۱۰۰	۲	۰	۰
تراشه	۳	۰	۰	۶۶	۲	۳۳	۱
ترشحات چشم	۱	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱
جمع کل	۵۰	۶	۳	۴۴	۲۲	۵۰	۲۵

جداسازی شده استافیلوکوک ساپروفیتیکوس بود. سویه‌های SeMCV45, S. epidermidis و haemolyticus S., ShIMCV14, در بخش‌های اورژانس داخلی و بخش ۲ جراحی دارای شیوع گسترده بود و این دو سویه در این بخش‌ها لوکالیزه شده بودند که اقدامات لازم در خصوص تعیین آنتی بیوتیک لازم با استفاد از آنتی بیوگرام انجام گرفت. از تعداد ۵ نمونه استافیلوکوک اپیدرمیدیس ارسالی جهت آزمایشات مولکولی تشخیص میکروبی تأیید گردید که ۳ نمونه با سویه نامشخص پس از انجام آزمون مولکولی تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنیک سویه استافیلوکوک همولیتیکوس می-باشند (به ترتیب نمونه‌های ۱۰، ۷، ۱) (نگاره ۲).

از ۵ نمونه استافیلوکوک اپیدرمیدیس که به صورت تصادفی آزمایشات مولکولی انجام گردید، تشخیص میکروبی آنها تأیید شد و ۳ نمونه با سویه نامشخص طبق جدول ۱ سویه آنها مشخص گردید. در بین تمامی نمونه‌های مورد آزمایش، سویه ای جداسازی شده از خلط، ترشحات چشم و DPL (نمونه از بیماران دیالیزی) تماماً استافیلوکوک اپیدرمیدیس جداسازی شد. در شیوع استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی بر حسب نوع نمونه، نوع بخش و بیماری ایجاد شده، تفاوت فاحش وجود دارد. در نمونه‌های کشت خون ۶۶/۶٪ و کشت زخم ۷/۲٪ سویه‌های جداسازی شده استافیلوکوک اپیدرمیدیس بود. نمونه‌هایی مانند تراشه، مایع پلور و نمونه ادرار، ۶۶-۶۰ درصد باکتری



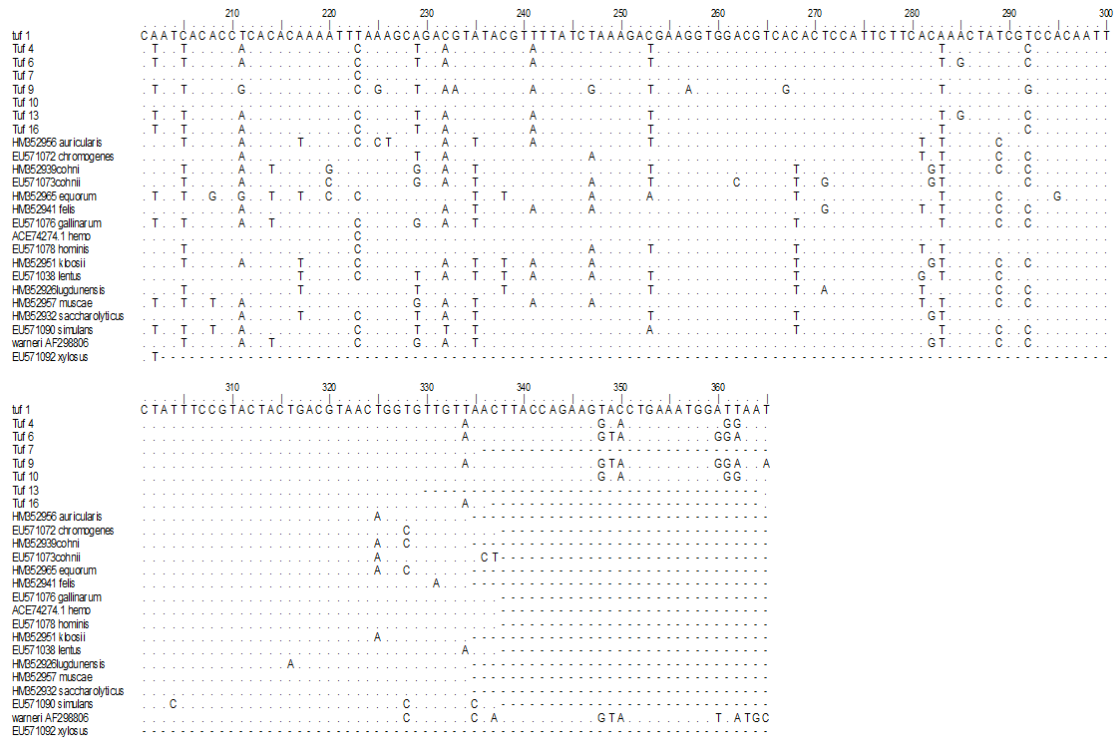
نگاره ۲- درخت فیلوژنی مبتنی بر اندیس Neighbor-joining بر اساس آنالیز فیلوژنتیک ژن Tuf هم عرض قرار گرفته از سویه‌های جدا شده در مقایسه با دیگر سویه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن

ژنوتیپینگ استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی جدا شده از نمونه‌های کلینیکی با استفاده از ژن *tuf* با تکنیک PCR-Sequencing



نگاره ۳- توالی‌های هم‌عرض قرار گرفته در زمینه‌ای از ۳۶۵ جفت باز از توالی‌های مورد استفاده در ارزیابی ژنتیکی سویه‌های جدا شده در مقایسه با سویه‌های گزارش شده

ادامه شکل:



در پژوهش حاضر در بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، وانکومايسين بهترین دارو برای درمان بیماری‌های ناشی از سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس بود. میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی به ۳۰-۲۵ درصد رسید که با توجه به مقاومت روز افزون نسبت به جتامايسين بایستی دقت لازم در استفاده از آن به عمل آید. در بیماری‌های ناشی از استافیلوکوک اپیدرمیدیس بعد از وانکومايسين بهترین آنتی‌بیوتیک‌ها بترتیب سفالکسین و افلوکساسیلین بود. در بیماری‌های ناشی از استافیلوکوک ساپروفیتیکوس بعد از وانکومايسين بهترین آنتی‌بیوتیک‌ها بترتیب سفتی زوکسیم، سفالکسین و سپیروفلوکساسین بود (جدول ۲).

بحث

امروزه، بیمارستان‌ها به دلیل استفاده روزافزون از ایمپلنت‌ها و اندام‌های مصنوعی در معرض عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی قرار دارند و با توجه به مطالعات مختلف بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بایستی تمهیدات لازم در خصوص چالش‌های پیش رو اندیشیده شود تا از بروز بیش از پیش عفونت‌های بیمارستانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی قابل انتقال جلوگیری شود.

در مطالعه Lourdes و همکاران در برزیل بر روی ۶۰ نمونه کشت خون ۷۷/۸٪ عفونت‌ها مربوط به استافیلوکوک اپیدرمیدیس و ۱۸/۷٪ مربوط به استافیلوکوک ساپروفیتیکوس بودند. نتیجه اینکه استافیلوکوک اپیدرمیدیس در سبتي سمی و آلودگی خون نقش اساسی دارد. در مطالعه اکرامی و همکاران در طی سال‌های ۲۰۰۷-۲۰۰۶ در اهواز از بین ۱۸۸ سویه استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی، ۴۹٪ استافیلوکوک اپیدرمیدیس بودند (۶).

پس از بررسی الگوی حساسیت هر باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با استفاده از روش دیسک دیفوزیون در مورد آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در پژوهش با آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری مطابق غلظت نیم مک فارلند باکتری به محیط مولر هیتون حاوی آنتی‌بیوتیک مورد نظر تلقیح و نتایج بعد از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲- بررسی الگوی حساسیت هر باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	استافیلوکوک اپیدرمیدیس		استافیلوکوک ساپروفیتیکوس		استافیلوکوک همولیتیکوس	
	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)
وانکومايسين	۲۱	۱۹ (۹۰٪)	۱۶	۱۴ (۸۷٪)	۲	۲ (۱۰۰٪)
سفالکسین	۱۷	۱۴ (۸۲٪)	۱۲	۱۰ (۸۳٪)	۱	۱ (۱۰۰٪)
سپروفلوکساسین	۱۷	۱۲ (۷۰٪)	۱۳	۱۰ (۷۷٪)	۰	۰
سفتي زوكسيم	۸	۱ (۱۲/۵٪)	۸	۸ (۱۰۰٪)	۰	۰
اکساسیلین	۱۱	۲ (۹٪)	۱۳	۱ (۷/۶٪)	۳	۰
جتامايسين	۱۷	۱۲ (۷۰٪)	۱۳	۹ (۶۹٪)	۰	۰
کلیندامایسین	۲۱	۱۳ (۶۱٪)	۱۸	۸ (۴۴٪)	۱	۰
افلوکساسیلین	۵	۴ (۸۰٪)	۲	۰	۰	۰
کلوکساسیلین	۹	۰	۷	۰	۲	۰
کوتریموکسازول	۱۴	۹ (۶۴/۲٪)	۱۴	۱۰ (۷۷٪)	۰	۰
اموکسی‌سیلین	۲۰	۵ (۲۵٪)	۱۱	۲ (۱۸٪)	۲	۰
سفازولین	۳	۱ (۳۳٪)	۲	۰	۰	۰
ازیترومایسین	۷	۲ (۲۸٪)	۳	۰	۰	۰

N = تعداد نمونه مورد آزمایش n = تعداد نمونه حساس به آنتی‌بیوتیک

جدول ۳- فاصله ژنتیک Pairwise genetic Distance بر اساس آنالیز توالی‌های هم‌عرض شده ژن *Tif* استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی جداسازی شده از نمونه‌های بالینی در مقایسه با دیگر استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی

tuf-1	tuf-4	tuf-6	tuf-7	tuf-9	tuf-10	tuf-13	tuf-16	aurK	chromoMoch	EU_CohM9	HM	tu-9	EU_8	AC	tu	EU_0	HM_0	EU_0	HM_0	EU_0	HM_0	EU_0	HM_0
tuf-4																							
tuf-6	0.042																						
tuf-7	0.005	0.052																					
tuf-9	0.042	0.005	0	0.047																			
tuf-10	0.01	0.047	0.052	0.015	0.052																		
tuf-13	0.042	0.005	0	0.047	0	0.052																	
tuf-16	0.042	0.005	0	0.047	0	0.052	0																
HM55295auriculanti	0.113	0.085	0.091	0.119	0.091	0.113	0.091																
EU571chromogenes	0.074	0.058	0.063	0.08	0.052	0.063	0.063	0.091	0.102														
HM55293colnii	0.113	0.091	0.096	0.119	0.083	0.102	0.096	0.063	0.08	0.074													
EU571Cohiii	0.108	0.091	0.096	0.113	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096
HM55295epycrom	0.201	0.156	0.166	0.201	0.096	0.091	0.154	0.154	0.113	0.119													
HM55294felis	0.091	0.085	0.091	0.096	0.091	0.091	0.154	0.154	0.085	0.085	0.15												
EU571gallinarum	0.131	0.102	0.108	0.136	0.091	0.119	0.108	0.091	0.085	0.08	0.052	0.052	0.113	0.085	0.108								
ACE74274Lthermo	0.005	0.042	0.085	0.01	0.108	0.085	0.047	0.108	0.108	0.069	0.108	0.102	0.197	0.085	0.125								
EU571078hominis	0.096	0.047	0.108	0.042	0.047	0.095	0.052	0.047	0.108	0.063	0.108	0.108	0.197	0.091	0.119	0.091							
HM552951locustii	0.113	0.091	0.052	0.119	0.052	0.102	0.096	0.052	0.069	0.08	0.036	0.108	0.108	0.096	0.108	0.113							
EU571lentus	0.125	0.111	0.096	0.131	0.096	0.125	0.136	0.096	0.156	0.102	0.148	0.015	0.203	0.102	0.148	0.119	0.113						
HM552928igdburseri	0.047	0.063	0.069	0.052	0.136	0.047	0.069	0.136	0.102	0.096	0.096	0.096	0.191	0.108	0.125	0.042	0.036	0.119	0.142				
HM55295musca	0.085	0.074	0.08	0.091	0.08	0.074	0.08	0.069	0.096	0.063	0.096	0.096	0.156	0.091	0.069	0.08	0.085	0.096	0.125	0.102			
HM55293saccharali	0.085	0.063	0.069	0.091	0.08	0.063	0.069	0.08	0.102	0.096	0.113	0.102	0.178	0.125	0.131	0.08	0.096	0.096	0.136	0.091	0.11		
EU571simulans	0.119	0.074	0.08	0.125	0.08	0.119	0.08	0.08	0.108	0.113	0.096	0.096	0.148	0.131	0.108	0.113	0.108	0.085	0.184	0.108	0.11	0.11	
HM55294298806	0.036	0.036	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.096	0.091	0.178	0.08	0.08	0.108	0.131	0.052	0.091	0.136	0.069	0.09

همانگونه که مشخص شد مطالعات متعددی در ایران بر روی عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک کوآگولاز منفی انجام شده است، اما در اکثر موارد تعیین گونه فقط به روش فنوتایپی نیز صورت گرفته است. در این طرح، با استفاده از روش‌های فنوتیپی، مولکولی و تعیین توالی محصولات PCR، سویه‌های ایزوله شده به طور دقیق در حد گونه شناسائی شدند و میزان فراوانی هر یک از سویه‌ها تعیین شد. البته لازم است تعداد نمونه بیشتری مورد آزمایش قرار گیرد تا با اطمینان بالاتر بتوان در رابطه با نقش گونه‌ها در عفونت‌های مختلف بحث کرد.

بر اساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Arroyo و همکاران بر روی نمونه‌های شیر بانوان مبتلا به ورم پستان انجام شد، میزان شیوع ورم پستان در بین بانوان هنگام شیرواری ۳۳-۳٪ بود و استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی خصوصاً استافیلوکوک اپیدرمیدیس نقش بسزائی در عفونت پستان داشتند (۲).

در مطالعه حاضر میزان مقاومت به آنتی بیوتیک (جنتامایسین) به ۳۰-۲۵ درصد رسید که با توجه به مقاومت روز افزون نسبت به این دارو بایستی دقت لازم در استفاده از آن به عمل آید که این یافته‌ها با نتایج رضوی و همکاران (۱۳۸۵) بر روی مبتلایان به بیماری‌های ناشی از سویه‌های متفاوت استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی در بیمارستان امام خمینی تهران که ۹۰٪ حساسیت به وانکومایسین را نشان دادند قابل مقایسه است، که پژوهش حاضر در بین ۱۳ آنتی بیوتیک مورد بررسی، وانکومایسین بهترین دارو برای درمان بیماری‌های ناشی از سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس بود.

در درمان بیماری‌های ناشی از سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، بعد از وانکومایسین بهترین آنتی بیوتیک‌ها بترتیب سفالکسین و افلوکساسیلین بود. در بیماری‌های ناشی از استافیلوکوک

ساپروفیتیکوس بعد از وانکومایسین، بهترین آنتی بیوتیک‌ها بترتیب سفتی زوکسم، سفالکسین و سیپروفلوکساسین بود. از آنجا که استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس با روش‌های فنوتایپی قابل شناسایی بودند و تعداد ۴۲ نمونه از کل نمونه‌ها را شامل می‌شدند، لذا فقط تعداد ۸ نمونه بطور دقیق شناسایی نگردید که برای بررسی دقیق و شناسایی سویه‌های احتمالی جدید از طریق ژنتیکی اقدام گردید.

توسعه تکنیک‌های PCR یک گام مهم در حل برخی ابهامات در رده بندی سویه‌های میکروبی بوده و باعث سهولت و دقت بالا در این امر شد. ژن *Tuf* در ژنوم تمام باکتری‌ها موجود بوده و طراحی پرایمر برای آن راحت‌تر از سایر ژن‌هاست. اطلاعات ژن *Tuf* ابزاری مهم برای رده‌بندی و رسم درخت فیلوژنی در سطح جنس و گونه است. شناسایی گونه‌های میکروبی از جمله استافیلوکوک‌ها اصولاً بر اساس استفاده از خصوصیات ظاهری استوار شده بود. با این حال استفاده از این روش در مواقعی در پاسخ به تغییر شرایط محیطی نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد. در این مطالعه تکثیر ژن *Tuf* که حاصل آن ۳۶۵ جفت باز بود در تمام نمونه‌ها آنالیز شد. توالی‌های هم عرض قرار گرفته در زمینه‌ای از ۳۶۵ جفت باز از توالی‌های مورد استفاده در ارزیابی ژنتیکی گونه‌های مورد نظر از جمله سویه‌های گزارش شده در نگاره ۳ نشان داده شده است.

نتایج بدست آمده نشان داد که ۳ سویه جدا شده ۱ و ۷ و ۱۰ در یک خوشه قرار دارند. این سه سویه بسیار نزدیک به هم و با ۰/۵٪ اختلاف ژنتیکی (فاصله ژنتیکی) با استافیلوکوک همولیتیکوس به این سویه تعلق دارند. سویه‌های ۷ و ۱۰ به ترتیب از نمونه CSF و کشت خون و سویه ۱ از نمونه پلور ایزوله شده بود.

نگاره ۳ میزان اختلاف در تعداد بازهای شناسایی شده در بین ۸ نمونه مورد بررسی در توالی‌های هم عرض قرار گرفته در زمینه‌ای از ۳۶۵ جفت باز از توالی‌های مورد استفاده را در

همولیتیکوس ۹۹ درصد و در سویه‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس به میزان ۹۵ درصد را گزارش نمود (۴). این مطالعه نشان داد که ۲ هاپلو تیپ ناشناخته که در یک دسته جداگانه قرار می‌گیرند، اختلاف فاحشی با سویه‌های وارنیتی، همولیتیکوس و هومونیس نشان می‌دهند که این امر می‌تواند سویه‌های مشاهده شده را به عنوان سویه‌های جدید جهت مطالعات بعدی مورد توجه قرار دهد.

این مطالعه ثابت کرد که استفاده از تعیین توالی ژن *tuf* به عنوان یک ابزار مناسب جهت تشخیص سویه‌های مختلف باکتری‌ها، بخصوص استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی می‌تواند جهت تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا و شناسایی ژن‌های عامل مقاومت آنتی بیوتیکی مورد توجه قرار گیرد.

فهرست منابع

- ۱- رضوی، مریم. ۱۳۸۵: ساب تایپینگ استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی به روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس، مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دوره ۲۸، شماره ۳: ۵۷-۵۳
- 2- Arroyo, R., Martin, V., Maldonado, A. (2010): Treatment Infectious Mastitis during Lactation Antibiotic Versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk. Clin. Infect. Dis. 50 (12):1551-1558
- 3- Delgado, S., Arroyo, R., Esther, J., Marine, M.L., delcompo, R. (2009): staphylococcus epidermidis strain isolated from breast milk of women suffering infection mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotic. BMC Microbio. 9:82
- 4- Heikens, E., Fleer, A., Pauw, A. (2005): Comparison of Genotypic and Phenotypic Method for Species-Level Identification Clinical Isolation Coagulase- Negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 43 (5):2286-2290
- 5- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Jour. of Molec. Evol., 16: 111-120.

مقایسه با سویه‌های گزارش شده نشان می‌دهد. با توجه به جدول ۳ اختلاف در تنوع نوکلئوتیدی بین سویه‌های بدست آمده بین ۰/۰۰۵ تا ۰/۰۵۲ درصد می‌باشد که این اختلاف موید میزان تنوع در بین ۸ نمونه مورد بررسی و احتمال وقوع موتاسیون‌های احتمالی در بین نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. همچنین طبق جدول ۳ بیشترین میزان اختلاف در فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بدست آمده را بین نمونه ۱ (*tuf*) و *St. Equinum* (۰/۲۰۳٪) مشاهده می‌شود که با توجه به درخت فیلوژنی رسم شده این سویه در دسته‌های پایین تری نسبت به دیگر خوشه‌ها قرار دارد. همچنین کمترین میزان اختلاف در فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بدست آمده را بین نمونه ۱ (*tuf*) و *St. homon* (۰/۰۰۵٪ درصد) مشاهده می‌شود که این دو سویه در یک کلاید (دلته) خود را نشان دادند که نشان دهنده قرابت نزدیک این گونه با سویه‌های بدست آمده در این مطالعه می‌باشد. رسم درخت‌های فیلوژنی Neighbor-Joining، توپولوژی مشابهی را ارائه می‌کنند که به وضوح استافیلوکوک‌های مطالعه شده را در دو دسته جداگانه قرار می‌دهد. ۲ هاپلو تیپ ناشناخته (نمونه ۴ نشان دهنده هاپلو تیپ اول و نمونه‌های ۱۳، ۶، ۹، ۱۶ تشکیل هاپلو تیپ دوم را داده‌اند) در یک دسته جداگانه هم قرابت و دارای نیای مشترک با سویه‌های وارنیتی، همولیتیکوس و هومونیس قرار می‌گیرد، در صورتیکه هاپلو تیپ‌های ۱ و ۷، ۱۰ در یک گروه خوهری همراه با استافیلوکوک همولیتیکوس با سویه‌های لاگدونسیس و هومونیس خوشه‌بندی شده‌اند (نگاره ۲).

Heikens (۲۰۰۵) با استفاده از ترسیم درخت فیلوژنیک و مقایسه هاپلو تیپ‌های بدست آمده سویه‌های استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی با اختلاف نوکلئوتیدی ۱ درصد از یکدیگر را در یک گروه خوهری طبقه بندی کرد. در آن مطالعه درصد همولوژی در بین سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس در ژن *Tuf* را ۱۰۰ درصد و در بین سویه‌های استافیلوکوک

- 6- Lourdes, M., de Souza R., de Cunha, P., de Souza L. M. S., de Magalhaes Lopes C. A. (2006): Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from new borns. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101 (6):661-668
- 7- Marascuilo, L.A., Slaughter, R.E. (1981). Statistical procedures for identifying possible sources of item bias based on \hat{A}^2 statistics. Journal of Educational Measurement, 18, 229-248.
- 8- Pasqual, B., Augusto, C., Montelli, J.B., Jacqueline, C.T., Lourdes, M.R. (2009): The role of virulence factor in the outcome of staphylococcal peritonitis in CAPD patients. BMC infec. Dis. 9:212.

J C P

JCP