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

افشین اژدری[۱]، سعید تمدنی‌جهرمی[۱*]، صدیقه جوادپور[۲]، امیراقبال خواجه‌رحیمی[۳]، مریم طلا[٤]، مریم انصاری[٥]

چکیده

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

تعداد ۵۰ نمونه استافیلوکوک‌های کواگولازمنفی ازنمونه‌های مختلف بالینی بیمارستان شهید محمدی بندرعباس جداسازی شد. روش‌های فنوتیپی شامل آزمون‌های بیوشیمیائی و روش‌های ژنوتیپی سکونسینگ ژن tuf به کار گرفته شد. سپس بلاست و رسم درخت فیلوژنیک انجام شد.

سویه‌هائی که از نمونه‌های بالینی جداسازی شدند شامل۲۵(۵۰٪) استافیلوکک اپیدرمیدیس،۲۲(٤٤٪) استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و ۳(٦٪) استافیلوکوک همولیتیکوس بودند. اغلب سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس ازنمونه‌های خون و ادرارجداسازی شدند. وانکومایسین به عنوان موثرترین آنتی بیوتیک وسپس سفالکسین و افلوکساسیلین آنتی‌بیوتیک‌های موثر بودند. بعد از بلاستینگ سویه‌های رفرانس و ردیف نمودن آنها با ۸ نمونه سکانس شده، درخت فیلوژنیک با روش Neighbor joining رسم شد. ۵ سویه دارای ۱۰۰٪ قرابت نوکلئوتیدی با*S. epidermidis strain SeMCV45* و ۳ سویه دارای ۹۹٪ قرابت با *S.haemolyticus strain ShlMCV14* بودند.

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

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

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۹ 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 دریچه‌های مصنوعی می‌شوند. این باکتری‌ها دارای گستردگی وسیعی در طبیعت بوده و جزء باکتری‌های بیماری زای فرصت طلب قلمداد می‌گردند. حدود ۷۵-۵۵٪ عفونت‌های بیمارستانی توسط آنها ایجاد می‌گردد.

با توجه به تنوع و گستردگی سویه‌ها و وجود عوامل بیماری‌زا، هزینه‌های بالایی جهت جداسازی، تشخیص و درمان آنها صرف می‌شود. تولید بیوفیلم در سطوح پلیمری ازجمله مشکلات عدیده ناشی از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی است با وجود این ماده ترشحی باکتری‌ها از استرس‌های ناشی از مواد شیمیائی، بیولوژیک و آنتی‌بیوتیک‌ها 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 *Agr, Luxs, AI2, AtLE* 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

۱*- مؤسسه تحقیقات علوم شیلات کشور، پژوهشکده 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.
٤- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قشم، قشم، ایران.
٥- بیمارستان شهید محمدی بندرعباس، هرمزگان، ایران.

Archive of SID
www.SID.ir

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 پزشک 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 بیوشیمیای و بیماری‌زایی آنها بدست آورد.

قبلا محیط کشت افتراقی بهترین روش شناسایی و ردیابی باکتری‌ها بودند سپس آزمون بیوشیمیایی وسرولوژیک نقش عمده‌ای عهده‌دار شده. اولین بار پس از کشف بخش ثابت اوپران در RNA ریبوزومی استفاده از نشانگرهای مولکولی یا پروب در میکروب شناسی آغاز شد. مثلا تشخیص مننژیت باکتریایی با استفاده از توالی یابی ژن srRNA ١٦ 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 وقت‌گیر 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 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 (elongingfactor-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 کشوراسپانیا 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 پریتونیت از ۵۱٪ مبتلایان سویه‌های مختلف استافیلوکوک کواگولاز منفی جداسازی گردید که به ترتیب استافیلوکوک اپیدرمیدیس ٢٤٪ استافیلوکوک همولیتیکوس ١١٪ و سایر سویه‌ها با اهمیت کمتر در مرتبه بعدی قرار داشته‌اند(۷).

بیشترین میزان بیماری‌ها بخصوص عفونت‌های دریچه قلب مصنوعی، اجزا، لوازم و سوندها، توسط استافیلوکوک اپیدرمیدیس بروز پیدا می‌کند به دلیل بیماری‌زایی و به خصوص مشکلاتی که در کاتترها 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.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش کار

این مطالعه در طی سال‌های ۹۰-۸۹ در بخش های 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 مورداستفاده که شامل محیط کشت فسفاتاز، فنیل فتالئین 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 (۲۱نمونه)، ادرار (٦نمونه)، ترشحات چشم (۱نمونه)، تراشه (۳نمونه)، عفونت زخم (۷نمونه)، پریتونئال (۲نمونه)، مایع پلورال (۵نمونه)، خلط (۱نمونه)، آسیت (۲نمونه)، CSF (مایع مغزی نخاعی) (۱نمونه)، DPL (نمونه بیماران دیالیزی) (۱نمونه)، توسط سواپ اخذ و به محیط تریپتوز سوی براث منتقل و در شرایط مناسب بلا فاصله 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 کواگولاز منفی از استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت با استفاده از تست‌های اوره آز، تخمیر قند مانیتول، تست فسفاتاز (محیط فسفاتاز آگار)، حساسیت به نوبیوسین و پلی میکسین B که برای این تست غلظت نیم مک فارلند از سوسپانسیون باکتری تهیه شد و به محیط مولر هینتون حاوی هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها تلقیح و نتایج بررسی وخصوصیات کلنی، سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس واستافیلوکوک ساپروفیتیکوس، از سایر استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی جداسازی شدند.

روند آزمایشات و جداسازی سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس در ابتدا استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت از کواگولاز 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 کواگولاز اقدام به جداسازی استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت از کواگولاز منفی گردید. بدین منظور کلنی باکتری را وارد لوله‌های حاوی پلاسمای انسانی (سرم حاوی هپارین) که قبلا آماده شده بود، نموده و به مدت ٦ ساعت انکوبه گردید، که هر کدام از نمونه‌ها که حاوی لخته بودند کواگولاز مثبت تشخیص داده شد و از بین نمونه‌ها حذف گردید و سایر نمونه‌ها کواگولاز منفی تلقی و جهت آزمایشات تکمیلی مورد بررسی قرار گرفتند.

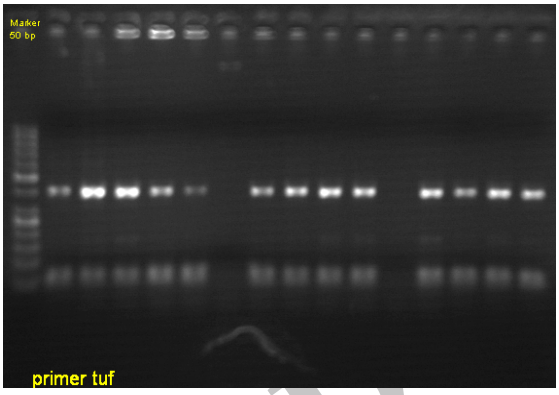
سپس آزمون‌های ذیل جهت جداسازی دو سویه ذکر شده استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس از سایر کواگولاز منفی‌ها انجام گردید به طوری که از همه نمونه‌ها بر روی محیط اوره آگار و مانیتول آگار کشت داده شد. جهت تشخیص تفریقی از تست‌های اوره، مانیتول، تست حساسیت به نوبیوسین و آزمون فسفاتاز استفاده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

جهت شناسائی سویه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس علاوه بر تستهای اوره از و مانیتول و سایر تست‌ها از تست حساسیت به پلی میکسین استفاده گردیدکه 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.

Archive of SID

www.SID.ir



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

PCR و تعیین توالی DNA

واکنش زنجیره پلیمراز 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 ۱pmol از هر پرایمر (F: 5′-GCCAGTTGAGGACGTATTCT-3، و R: CATTTCAGTACCTTCTGGATT3′ [٤] ، 2.5 mm $MgCL_2$ (از ۱/۵ تا ۳ چک شد)، 2mm 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 نمونه‌ها برای تعیین توالی ارسال گردید.

رسم درخت فیلوژنیک

الکتروفروگرام های تکی تصحیح شده و توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار clausal 1.5c با تنظیم دستی هم عرض شدند. توالی‌های بدست آمده نتایجی که از مقایسه بین این توالی‌ها با توالی‌های ژن tuf موجود از گونه‌های مهم بیماری‌زا حاصل شده بود را تائید کرد در این تحقیق از توالی‌های DNA دیگر گرفته شده از بانک جهانی ژن (NCBI) برای مقایسه و تراز کردن توالی‌ها استفاده شد (نگاره ۳). از نرم‌افزار MEGA 4 برای محاسبه فاصله ژنتیکی و رسم درخت فایلوژنی که میزان قرابت گونه‌های مورد نظر را بر اساس مدل Kimura 2-parameter ترسیم می‌نماید، استفاده گردید (۵).

اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از شاخص‌های آمار توصیفی مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. جهت بررسی الگوی حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در بیمارستان تست آنتی بیوگرام انجام شد. پس از جمع‌آوری اطلاعات در ارتباط با مصرف آنتی بیوتیک و حساسیت و مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های 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، باکتری‌هایی که به روش‌های فنوتیپینگ و بیوشیمیائی شناسائی شدند، ۲۵ نمونه (۵۰٪) استافیلوکوک اپیدرمیدیس، ۲۲ نمونه (٤٤٪) استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و ۳ نمونه (٦٪) سایر سویه‌ها استافیلوکوک کواگولاز منفی بودند که در جدول ۱ شرح داده شده است. از انجا که نمونه‌ها از افراد با بیماری‌های مختلف و در فصول متفاوت مورد آزمایش قرار گرفت، هیچ تفاوت معنی داری نسبت به فصول متفاوت و سن و جنس بیماران در بروز بیماری‌های ناشی از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی مشاهده نگردید.

Archive of SID
www.SID.ir

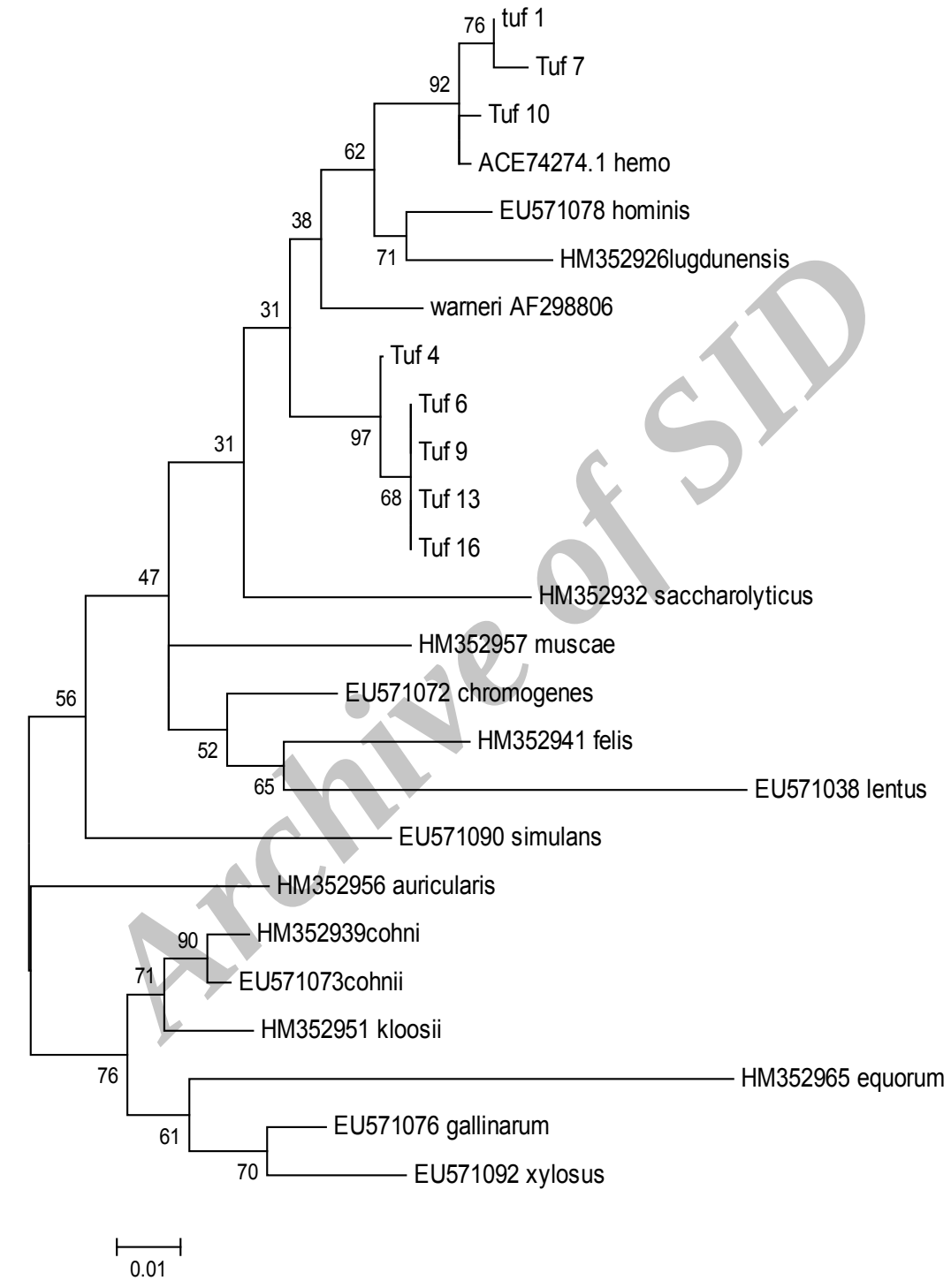
جدول ۱ـ فراوانی استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی بر حسب نوع نمونه

نمونه	تعداد نمونه	درصد فراوانی نسبی	فراوانی استافیلوکک همولیتیکوس	درصد فراوانی نسبی	فراوانی استافیلوکک ساپروفیتیکوس	درصد فراوانی نسبی	فراوانی استافیلوکک اپیدرمیدیس
کشت خون	۲۱	۵/۵	۱	۲۸/۵	٦	٦٦/٦	١٤
کشت ادرار	٦	۰	۰	٦٦	٤	۳۳	۲
مایع پلور	۵	۲۰	۱	٦۰	۳	۲۰	۱
کشت زخم	۷	۰	۰	۲۸	٤	۷۲	۳
آسیت	۲	۰	۰	۵۰	۱	۵۰	۱
DPL	۱	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱
CSF	۱	۱۰۰	۱	۰	۰	۰	۰
خلط	۱	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱
پریتونئال	۲	۰	۰	۱۰۰	۲	۰	۰
تراشه	۳	۰	۰	٦٦	۲	۳۳	۱
ترشحات چشم	۱	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱
جمع کل	۵۰	٦	۳	٤٤	۲۲	۵۰	۲۵

از ۵ نمونه استافیلوکک اپیدرمیدیس که به صورت تصادفی آزمایشات مولکولی انجام گردید، تشخیص میکروبی آنها تائید 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) تماما استافیلوکوک اپیدرمیدیس جداسازی شد. در شیوع استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی برحسب نوع نمونه، نوع بخش و بیماری ایجاد شده، تفاوت فاحش وجود دارد. در نمونه‌های کشت خون ٦٦/٦٪ و کشت زخم ۷۲٪ سویه های جداسازی شده استافیلوکوک اپیدرمیدیس بود. نمونه‌هائی مانند تراشه، مایع پلور و نمونه ادرار، ٦٦-٦۰ درصد باکتری جداسازی شده استافیلوکوک ساپروفیتیکوس بود. سویه های S. epidermidis , SeMCV45 و haemolyticus S.„ShlMCV14 دربخش های اورژانس داخلی و بخش۲ 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 تائید گردید که ۳ نمونه با سویه نامشخص پس از انجام آزمون مولکولی تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنیک سویه استافیلوکک همولیتیکوس می-باشند (به ترتیب نمونه‌های ۱۰، ۷، ۱) (نگاره ۲).

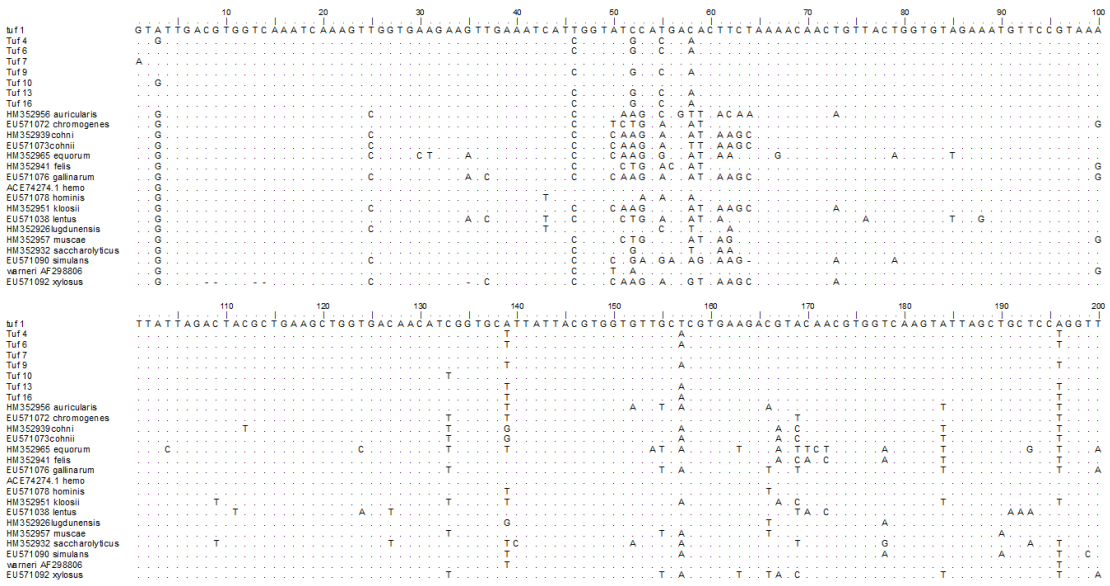
Archive of SID

www.SID.ir



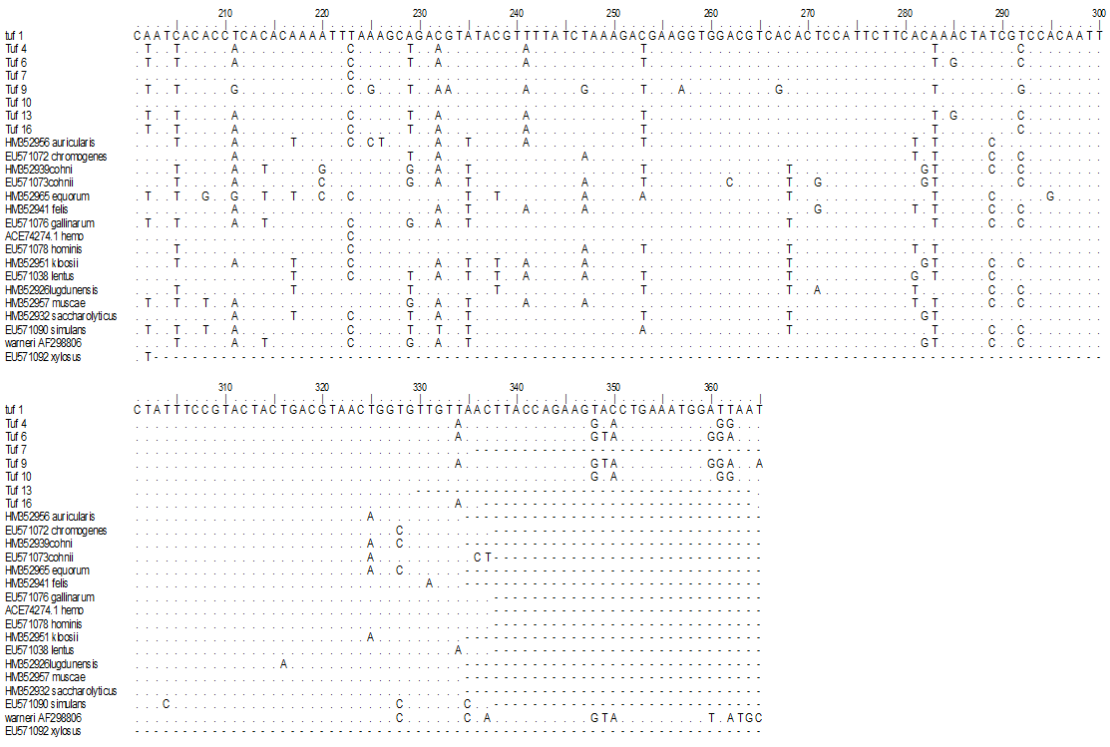
نگاره ۲ـ درخت فیلوژنی مبتنی بر اندیس Neighbor-joining بر اساس آنالیز فیلوژنتیک ژن Tuf هم عرض قرار گرفته از سویه‌های جدا شده در مقایسه با دیگر سویه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن

Archive of SID
www.SID.ir



نگاره ۳ـ توالی‌های هم عرض 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:



www.SID.ir

پس از بررسی الگوی حساسیت هر باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با استفاده از روش دیسک دیفوژیون در مورد آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در پژوهش با آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری مطابق غلظت نیم مک فارلند باکتری به محیط مولر هینتون حاوی آنتی بیوتیک مورد نظر تلقیح و نتایج بعد از ۲٤ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲ـ بررسی الگوی حساسیت هر باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

آنتی بیوتیک	استافیلوکوک اپیدرمیدیس		استافیلوکوک ساپروفیتیکوس		استافیلوکوک همولیتیکوس	
	n (%)	N	n (%)	N	n	N
وانکومایسین	۱۹ (٪۹۰)	۲۱	۱٤(٪۸۷)	۱٦	۲(٪۱۰۰)	۲
سفالکسین	۱٤(٪۸۲)	۱۷	۱۰(٪۸۳)	۱۲	۱(٪۱۰۰)	۱
سیپروفلوکساسین	۱۲ (٪۷۰)	۱۷	۱۰(٪۷۷)	۱۳	۰	۰
سفتی زوکسیم	۱(٪۱۲/۵)	۸	۸(٪۱۰۰)	۸	۰	۰
اکساسیلین	۱(٪۹)	۱۱	۱(٪۷/٦)	۱۳	۳	
جنتامایسین	۱۲(٪۷۰)	۱۷	۹(٪٦۹)	۱۳	۰	۰
کلیندامایسین	۱۳(٪٦۱)	۲۱	۸(٪٤٤)	۱۸	۰	۱
افلوکساسیلین	٤(٪۸۰)	۵	۰	۲	۰	۰
کلوکساسیلین	(۰٪)۰	۹	۰	۷	۰	۲
کوتریموکسازول	۹(٪٦٤/۲)	۱٤	۱۰(٪۷۷)	۱٤	۰	۰
اموکسی سیلین	۵(٪۲۵)	۲۰	۲(٪۱۸)	۱۱	۰	۲
سفازولین	۱(٪۳۳)	۳	۰	۲	۰	۰
ازیترومایسین	۲(٪۲۸)	۷	۰	۳	۰	۰

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

جدول ۳ـ فاصله ژنتیک Pairwise genetic Distance بر اساس آنالیز توالی‌های هم عرض شده ژن *Tuf* استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی جداسازی شده از نمونه‌های بالینی در مقایسه با دیگر استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی

	tuf-1	tuf-4	tuf-6	tuf-7	tuf-9	tuf-10	tuf-13	tuf-16	auric	chrom	HMcoh	EUCoh	HMeq	HM	fe.EU8#	AC he	EUho	HM.kl	EUle	HMlug	HMnu	HMsa	EUsi
tuf-1																							
tuf-4	0.047																						
tuf-6	0.042	0.005																					
tuf-7	0.005	0.052	0.047																				
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																
HM352956auricular	0.113	0.085	0.091	0.119	0.091	0.113	0.091																
EU571:chromogenes	0.074	0.058	0.063	0.08	0.052	0.063	0.063	0.091	0.102														
HM352939cohnii	0.113	0.091	0.096	0.119	0.063	0.102	0.096	0.063	0.08	0.074													
EU571:Cohnii	0.108	0.091	0.096	0.113	0.096	0.096	0.096	0.096	0.069	0.074	0.01												
HM352965equorom	0.203	0.16	0.166	0.209	0.096	0.191	0.166	0.096	0.154	0.154	0.119	0.119											
HM352941felis	0.091	0.085	0.091	0.096	0.166	0.091	0.091	0.166	0.119	0.052	0.085	0.085	0.16										
EU571:gallinarum	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	0.108									
ACE74274.1hemo	0.005	0.042	0.085	0.01	0.108	0.005	0.047	0.108	0.108	0.069	0.108	0.102	0.197	0.085	0.125								
EU571078hominis	0.036	0.047	0.108	0.042	0.047	0.036	0.052	0.047	0.108	0.063	0.108	0.108	0.197	0.091	0.119	0.031							
HM352951kloosii	0.113	0.091	0.052	0.119	0.052	0.102	0.096	0.052	0.069	0.08	0.026	0.026	0.119	0.096	0.063	0.108	0.113						
EU571:lentus	0.125	0.011	0.096	0.131	0.096	0.125	0.136	0.096	0.166	0.102	0.148	0.015	0.203	0.102	0.148	0.119	0.113	0.16					
HM352926lugdunsis	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				
HM352957mucosa	0.085	0.074	0.08	0.091	0.08	0.074	0.08	0.069	0.096	0.063	0.096	0.096	0.16	0.091	0.069	0.08	0.085	0.096	0.125	0.102			
HM352932saccharol	0.085	0.063	0.069	0.091	0.69	0.085	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		
EU571:simulance	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	
warneriAF298806	0.036	0.036	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.042	0.096	0.042	0.096	0.091	0.178	0.08	0.108	0.031	0.052	0.091	0.136	0.069	0.09	0.07	0.1

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

بحث

امروزه، بیمارستان‌ها به دلیل استفاده روزافزون از ایمپلنت ها و اندام‌های مصنوعی در معرض عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی قرار دارند و با توجه به مطالعات مختلف برروی مقاومت آنتی بیوتیکی بایستی تمهیدات لازم در خصوص چالش‌های پیش رو اندیشیده شود تا از بروز بیش از پیش عفونت‌های بیمارستانی و مقاومت آنتی بیوتیکی قابل انتقال جلوگیری شود.

در مطالعه Lourdes و همکاران در برزیل بر روی ٦۰ نمونه کشت خون ۷۷/۸٪ عفونت‌ها مربوط به استافیلوکوک اپیدرمیدیس و ۱۸/۷٪ مربوط به استافیلوکوک ساپروفیتیکوس بودند. نتیجه اینکه استافیلوکوک اپیدرمیدیس در سپتی سمی و آلودگی خون نقش اساسی دارد. درمطالعه اکرامی وهمکاران درطی سال های۲۰۰۷-۲۰۰٦ دراهواز از بین ۱۸۸ سویه استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی، ٤۹٪ استافیلوکوک اپیدرمیدیس بودند(٦).

Archive of SID

www.SID.ir

همانگونه که مشخص شد مطالعات متعددی در ایران برروی عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک کواگولاز 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 ومیزان 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 مبتلابه ورم پستان انجام شد، میزان شیوع ورم پستان دربین بانوان هنگام شیرواری ۳۳-۳٪ بود و استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی خصوصاً استافیلوکوک اپیدرمیدیس نقش بسزائی درعفونت 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 آیدکه این یافته ها با نتایج رضوی و همکاران (۱۳۸۵) بر روی مبتلایان به بیماری‌های ناشی از سویه‌های متفاوت استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی دربیمارستان امام خمینی تهران که ۹۰٪ حساسیت به وانکومایسین را نشان دادند قابل مقایسه است، که پژوهش حاضر دربین 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 آنتی‌بیوتیک‌ها بترتیب سفالکسین و افلوکساسیلین بود. در بیماری‌های ناشی از استافیلوکوک ساپروفیتیکوس بعد از وانکومایسین، بهترین آنتی‌بیوتیک‌ها بترتیب سفتی زوکسم، سفالکسین و سیپروفلوکساسین بود.

از انجا که *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* با روش‌های فنوتایپی قابل شناسایی بودند و تعداد ٤٢ 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 باکتری ها 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 اصولا 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 ۳٦٥ جفت باز بود در تمام نمونه‌ها آنالیز شد. توالی‌های هم عرض قرار گرفته در زمینه‌ای از ۳٦٥ 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 و۷ و ۱۰ دریک 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. سویه های 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 ۳٦٥ جفت باز از توالی‌های مورد استفاده را در

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه با سویه‌های گزارش شده نشان می دهد. با توجه به جدول ۳ اختلاف در تنوع نوکلئوتیدی بین سویه‌های بدست آمده بین ۰/۰۰۵ تا ۰/۰۵۲ درصد می باشد 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* ۱) و *St. Equinum* (۰/۲۰۳٪) مشاهده می‌شود که با توجه به درخت فیلوژنی رسم شده این سویه در دسته های پایین تری نسبت به دیگر خوشه ها قرار دارد. همچنین کمترین میزان اختلاف در فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بدست آمده را بین نمونه ۱ (*tuf* ۱) و *St. homon* (۰/۰۰۵ درصد) مشاهده می‌شود که این دو سویه در یک کلاید (دسته) خود را نشان دادند که نشان دهنده قرابت نزدیک این گونه با سویه‌های بدست آمده در این مطالعه می باشد.

رسم درخت‌های فیلوژنی Neighbor-Joining، توپولوژی مشابهی را ارایه می‌کنند که به وضوح استافیلوکوک‌های مطالعه شده را در دو دسته جداگانه قرار می‌دهد. ۲ هاپلوتیپ ناشناخته (نمونه ٤ نشان دهنده هاپلوتیپ اول و نمونه‌های ۱۳،۹،٦ ،۱٦ تشکیل هاپلوتیپ دوم را داده‌اند) در یک دسته جداگانه هم قرابت و دارای نیای مشترک با سویه‌های وارنیی، همولیتیکوس و هومونیس قرار می‌گیرد، در صورتیکه هاپلوتیپ‌های ۱و ۷، ۱۰ در یک گروه خواهری همراه با استافیلوکوک همولیتیکوس با سویه‌های لاگدوننسیس و هومونیس خوشه‌بندی شده‌اند (نگاره ۲).

Heikens (۲۰۰۵) با استفاده از ترسیم درخت فیلوژنیک و مقایسه هاپلوتیپ های بدست آمده سویه های استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی با اختلاف نوکلئوتیدی ۱ درصد از یکدیگر را در یک گروه خواهری طبقه بندی کرد. در آن مطالعه درصد هومولوژی دربین سویه های استافیلوکوک اپیدرمیدیس در ژن Tuf را ۱۰۰ درصد و در بین سویه‌های استافیلوکوک همولیتیکوس ۹۹ درصد و در سویه‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس به میزان ۹۵ درصد را گزارش نمود (٤).

این مطالعه نشان داد که ۲ هاپلوتیپ ناشناخته که در یک دسته جداگانه قرار می گیرند، اختلاف فاحشی با سویه‌های وارنیی، 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 کواگولاز 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 کواگولاز 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. Infec. 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., Paauw, 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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 Â2 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.

Archive of SID

www.SID.ir