دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۳، صفحه ۳۳۵ – ۳۲۶ (مرداد و شهریور ۱۳۹۳)
ISMJ 2014; 17(3): 326-335

مقایسه روش‌های مولکولی در تیپ‌بندی اپیدمیولوژیک سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس

احسان‌اله غزنوی‌راد [1*]، علی‌رضا آموزنده نوباوه [1]

[1] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۱۰- پذیرش مقاله: ۹۱/۵/۴)

چکیده

زمینه: در این تحقیق روش‌های مولکولی موجود جهت تیپ‌بندی اپیدمیولوژیک استاف اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مانند روش الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار (PFGE)، تیپ‌بندی بر مبنای توالی‌یابی لوکوس‌های چندگانه (MLST)، تیپ‌بندی بر مبنای توالی‌یابی ژنی پروتئین Staphylococcus aureus protein A typing (Spa) A، تیپ‌بندی به‌روش واحد تکراری مستقیم Direct repeat unit typing (dru) و بررسی تنوع در کاست کروموزومی Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec) mec از نظر قدرت تمایز مقایسه شده‌اند.

مواد و روش‌ها: از ۳۸۹ ایزوله که قبلاً بررسی اپیدمیولوژیکی مولکولی بر روی آن‌ها انجام شده بود ۶۱ نمونه غیرتکراری انتخاب و تحت تیپ‌بندی با الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار و تیپ‌بندی به‌روش واحد تکراری مستقیم قرار گرفتند. شاخص تمایز سیمپسون جهت تعیین قدرت تمایز هر روش و ضریب اتورگرسیون جهت تعیین قدرت تیپ‌بندی محاسبه گردید.

یافته‌ها: ۶۱ سوش مورد مطالعه به‌ترتیب با روش PFGE، MLST، spa، SCCmec و dru به ۷، ۶، ۶، ۱۲ و ۱۹ تیپ تقسیم شدند. ارزیابی قدرت تمایز برای هر روش طبقه‌بندی با شاخص تنوع سیمپسون روش‌های dru وPFGE را به‌عنوان بیشترین قدرت تمایز تعریف کرد.

نتیجه‌گیری: با این مطالعه می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که اگرچه تیپ‌بندی با روش dru روشی با قدرت تمایز بالا، ارزان و آسان جهت بررسی اپیدمیولوژیک سویه‌های استاف اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از تیپ ST۲۳۹ می‌باشد ولی استفاده از ترکیب این روش‌ها مثل (dru و PFGE) می‌تواند نتایج بهتری را جهت ارزیابی عفونت‌های بیمارستانی ارائه دهد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت به متی‌سیلین، الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار، مقایسه روش‌های مختلف تیپ‌بندی ملکولی

* اراک، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

E-mail: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین[1] (MRSA) قادر به تولید طیف وسیعی ازعفونت‌ها است که شدت این عفونت‌ها از عفونت پوستی ضعیف تا پنومونی نکروزکننده متغیر است. این باکتری خطرناک به‌علت بروز مداوم و فزاینده عفونت در محیط بیمارستان (HA-MRSA)[2] و ایجاد عفونت‌های کسب شده مهم از جامعه (CA-MRSA)[3] کانون توجه شدید می‌باشد و شیوع بالای آن در اکثر مناطق جهان سبب افزایش معنی‌داری در مرگ و میر و هزینه‌های مربوط به درمان بیماران شده است (۱).

هر چند تلاش‌ها جهت کنترل و جلوگیری از انتشار این پاتوژن از طریق غربالگری بیماران، پرسنل و محیط بیمارستان یک اولویت عمده در برنامه‌های کنترل عفونت است، تکیه بر روش‌های طبقه‌بندی، به‌عنوان ابزارهای مهمی جهت توصیف صفات اختصاصی ژنتیکی ایزوله‌ها می‌تواند کمک بسیار مهمی جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیک به‌منظور ردیابی منبع و یافتن راه‌های انتقال MRSA باشد (۶-۲).

الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار (PFGE)[4]، که یک روش ژنوتیپیک برای ارزیابی پلی‌مورفیسم DNA کروموزومی است، روش استاندارد طلایی جهت تجزیه و تحلیل اپیدمیولوژیکی پاتوژن‌های مشکل‌ساز بیمارستان، شامل استافیلوکوکوس اورئوس و MRSA می‌باشد (۷ و ۸). همچنین بررسی تنوع در کاست کروموزومی ژن mec که عامل مقاومت به متی‌سیلین (SCCmec)[5] است نیز از روش‌های مبتنی بر باند الکتروفورزی است که قادر به تمایز سویه‌های کسب شده از بیمارستان (HA-MRSA) و سویه‌های کسب شده از جامعه (CA-MRSA) می‌باشد (۹). البته امروزه روش‌های جدیدتر مبتنی بر سکانس اسیدهای نوکلئیک نیز در دسترس می‌باشد که از این تکنیک‌ها برای بررسی اپیدمیولوژیکی و همچنین مقایسه سویه‌های یک ناحیه جغرافیایی خاص با سویه‌های سایر نقاط جهان استفاده می‌شود (۱۰). تیپ‌بندی بر پایه‌ی توالی اسیدهای نوکلئیک (DNA) به‌علت پیشرفت در روش‌های توالی‌یابی، سهولت انتقال اطلاعات و قابلیت قیاس بسیار خوب نتایج از طریق پایگاه داده‌های online در حال ترویج و فزونی هستند. از جمله این روش‌ها می‌توان به تیپ‌بندی بر مبنای توالی‌یابی لوکوس‌های چندگانه (MLST)[6] و توالی‌یابی ژنی پروتئین A استافیلوکوکی (Spa)[7] می‌باشند اشاره نمود (۱۱ و ۱۲).

اخیراً نیز درون ناحیه‌ی کاست کروموزومی ژن mec که عامل مقاومت به متی‌سیلین (SCCmec)[8] است نیز یک تکرار ۴۰ جفت بازی پشت سر هم با بازهای متغیر یا واحد تکراری مستقیم (dru)[9] که در مجاورت ناحیه ژن IS۴۳۱ قرار گرفته شناسایی شده که به‌علت توانایی بالای آن در تمایز دادن کلون‌های EMRSA-۱۵ و ۱۶- و ۱۶-EMRSA، دو ایزوله‌ای که با سایر روش‌ها قابل تمایز نیستند، مورد توجه قرار گرفته است (۱۳ و ۱۴).

از بین روش‌های نام برده شده بالا اگر چه MLST یک روش کافی برای تشخیص ارتباطات نزدیک آشکار بین سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس است اما برای مطالعه‌ی تفاوت‌های ظریف بین سوش‌ها، شایستگی کمتری دارد. طبقه‌بندی Spa این چنین

[1] Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
[2] Hospital Acquired
[3] Community Acquired
[4] Pulsed Field Gel Electrophoresis
[5] Staphylococcal Cassette Chromosome mec
[6] Multi Locus Sequence Typing
[7] Staphylococcus protein A typing
[8] Staphylococcal Cassette Chromosome mec
[9] direct repeat unit

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

تفاوت‌های ژنومیکی کوچک را بهتر آشکار می‌کند اما ممکن است قابلیت اجرای آن به‌علت رویدادهای نوترکیبی ژنومیکی کاهش یابد. به‌عنوان مثال هیچ یک از دو طبقه‌بندی MLST و Spa قادر نیستند که بین سوش‌های MRSA برزیلی و مجارستانی تفاوت قائل شوند (۱۵).

امروزه قدرت تفکیک به‌دست آمده توسط روش‌های تیپ‌بندی MLST، SCCmec، spa، PFGE و dru، به‌وسیله‌ی شاخص تنوع سیمپسون (SID)[10] محاسبه می‌گردد. قدرت تفکیک به‌صورت ریاضی با احتمال اینکه دو سوش تصادفی انتخاب شده از میان جمعیت از نظر روش تیپ‌بندی متفاوت باشند تعریف شده است. میزان شاخص از صفر تا یک می‌باشد که مقدار نزدیک به صفر، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم و مقدار نزدیک به یک، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالاست (۸). گرچه سطح قابل قبول تفکیک به تعدادی از فاکتورها بستگی خواهد داشت، اما یک شاخص بزرگ‌تر از ۰/۹ مطلوب می‌باشد (۱۶).

علاوه‌بر این قدرت تیپ‌بندی روش‌های فوق نیز با محاسبه ضریب اتورگرسیون تعیین گردید (۷).

بنابراین، هدف از مطالعه‌ی حاضر مقایسه روش‌های مولکولی موجود مانند تیپ‌بندی بر مبنای کاست کروموزومی ژن mec (SCCmec)، الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار (PFGE)، توالی‌یابی ژنی پروتئین A استافیلوکوکی (Spa)، تیپ‌بندی بر مبنای توالی لوکوس‌های چندگانه (MLST) و طبقه‌بندی بر اساس dru از نظر قدرت تمایز و تفکیک سویه‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۶۱ ایزوله از ۳۸۹ ایزوله‌ی MRSA که از اکتبر۲۰۰۷ تا نوامبر ۲۰۰۸ پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه پوترا از بیمارستان مرکزی آموزشی شهر کوآلالومپور در مالزی جمع‌آوری شده بودند و قبلاً با تیپ‌بندی MLST، SCCmec و spa مطالعه شده بودند انتخاب و وارد این مطالعه شدند. مشخصات سوش‌های جدا شده از نمونه‌های کلینیکی قبلاً توضیح داده شده است (۱۷ و ۱۸). ایزوله‌ها طوری انتخاب شدند که تکراری نبوده، متنوع بوده و نشان‌دهنده‌ی تمام انواع MLST و spa شناسایی شده در مطالعه باشند.

در مطالعه‌ی حاضر، ۶۱ ایزوله فوق، پس از هضم توسط آنزیم SmaI در معرض الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار (PFGE) قرار گرفته و همچنین مطابق روش توصیف شده توسط گورینگ (Goering) و همکاران (۱۴) مورد آنالیز توالی ناحیه‌ی dru مرتبط با mec قرار گرفتند (http://www.dru-typing.org) که در شکل یک قابل مشاهده هستند.

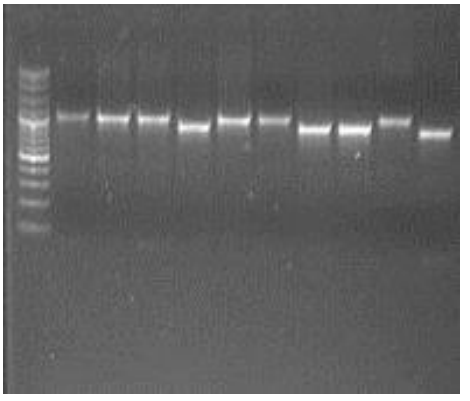
جهت محاسبه شاخص تنوع سیمپسون (SID) از ارزیابی کمّی آنلاین انجام شده توسط ابزار قراردادی طبقه‌بندی استفاده گردید و این شاخص با ضریب اطمینان (CI) تقریبی ۹۵ درصد محاسبه شد (http://www.darwin.phyloviz.net). به‌علاوه توانایی طبقه‌بندی ایزوله‌ها با روش‌های مختلف همراه با ضریب اتورگرسیون Auto regression (AR)، که معمولاً جهت سنجش هم‌خوانی روش‌های طبقه‌بندی استفاده می‌شود، محاسبه گردید.

[10] Simpson index of diversity

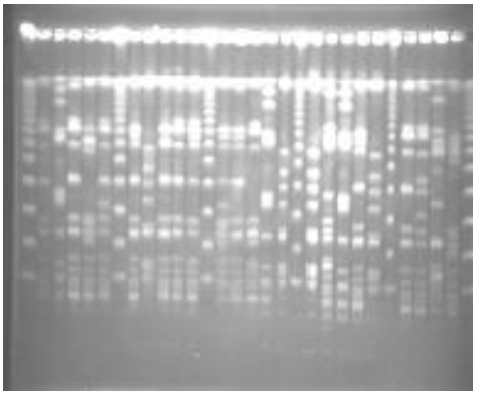
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

یافته‌ها

گرچه به‌وسیله‌ی روش‌های فوق همه ایزوله‌ها به‌خوبی دسته‌بندی شده‌اند، اما هدف مطالعه حاضر تعیین این موضوع بود که کدام‌یک از دسته‌بندی‌ها همراه با الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار (PFGE) به‌عنوان استاندارد طلایی، به تفکیک بیشتر سویه‌ها کمک خواهد کرد. ۶۱ سوش مورد مطالعه به‌ترتیب با روش PFGE، MLST، spa، SCCmec و dru به ۷، ۶، ۶، ۱۲و ۱۹ تیپ تقسیم شدند. همان‌طور که در شکل یک نشان داده شده است، PFGE، dru، MLST، Spa و SCCmec دارای تمایز یکسانی در طبقه‌بندی ایزوله‌های ST۱۸۸ و ST۱ و هستند.



(الف)



(ب)

شکل ۱) الف) الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار PFGE، ب) ژتیپ‌بندی با روش dru

ایزوله‌های ST۲۲ دو نوع dru (dt۱۰a و dt۱۰m) و سه نوع spa (۱۰۳۲، ۱۳۲۱۳ و ۱۴۱۸۴) نشان دادند (شکل ۲). ایزوله‌های ST۷ با کلیه‌ی روش‌ها به‌عنوان یک رده‌ی تک کلونی رفتار می‌کنند. به هر حال کمتر از ۷۰ درصد شباهت الگو با PFGE، برای این ایزوله‌ها مشاهده شد. در بین ۳۳ ایزوله‌ی متعلق به CC۸ (Clonal Complex 8)، ۳۲ سوش آن‌ها ST۲۳۹ بودند که ۲۳ و ۹ سوش از آن‌ها به‌ترتیب کاست کروموزومی (SCCmec) نوع IIIa و III را حمل می‌کردند. یک سویه باقیمانده نیز ST۱۲۸۳(CC۸) بود که SCCmecIIIa را نشان داد. SCCmec IIIa با تایپ‌های t۰۳۷Spa؛ t۱۳۸، t۴۲۱ مرتبط بود در حالی که SCCmec III با تایپ‌های Spa ۴۲۱۳، t۴۲۵۰، t۲۵۷۵ و t۰۳۷ همراه بود. به‌علاوه یک ایزوله (ایزوله ۵۵۴) که قابل طبقه‌بندی با Spa نبود، تحت عنوان dt13j طبقه‌بندی dru شد. با روش الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار (PFGE)، شباهت بین سویه‌هایی که در کلون CC۸ قرار داشتند (ST۲۳۹ و ST۱۲۸۳) از ۶۵ الی ۱۰۰ درصد متغیر بود. در مقابل طبقه‌بندی dru یک تمایز واضح‌تری را بین ایزوله‌های SCCmec IIIa و III نشان داد.

ایزوله‌های SCCmec IIIa، نه تایپ dru را نشان دادند که شامل (dt۱۳e، dt۱۱aa، dt۱۳g، dt۱۳h، dt۱۳d، dt۱۳j، dt۱۵e، dt۹w و dt۱a) می‌باشند، در حالی که برای SCCmec III هفت تایپ مشاهده شد (dt۱۲h، dt۱۴c، dt۱۲g، dt۱۴d، dt۱۴b، dt۱۳d و dt۱۳i). در بین این ۱۶ تایپ فقط dt۱۳d در هر دو ایزوله‌های SCCmec IIIa و III یافت شد. نکته جالب توجه اینکه سویه‌های غالب ST۲۳۹- t۰۳۷، ۱۰ تایپ متفاوت از dru را نشان دادند (dt۱۵e،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

dt۱۳d، dt۱۳e، dt۱۳g، dt۱۳i، dt۱۴b، dt۱۴d، dt۱۲h، dt۱۱a، dt۹w) که در ۸ خوشه الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار (PFGE) قرار گرفت (L، K، J، I، H، G، F، D).

جهت بررسی قدرت تفکیک روش‌های مختلف نیز مقادیر SID محاسبه گردید که مقادیر به‌دست آمده برای مجموعه داده‌های ما در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱) توانایی تمایز روش‌های تیپ‌بندی برای مجموعه داده‌های آنالیز شده (کل مجموعه،n=۶۱)

95% Confidence Interval	SID	Typeability	No. of types	Typing technique
(۸۵/۸۱-۹۲/۶۶)	۸۹/۲۳	۱۰۰	۱۵	PFGE
(۷۲/۳۲-۸۷/۹۰)	۸۰/۱۱	۹۶/۷	۱۳	spa
(۸۵/۴۴-۹۳/۵۸)	۸۹/۵۱	۱۰۰	۱۹	dru
(۵۹/۲۵-۷۹/۶۶)	۶۹/۴۰	۱۰۰	۶	MLST
(۶۴/۸۵-۷۴/۴۶)	۷۰/۶۶	۱۰۰	۴	SCCmec

برای به‌دست آوردن توافق و هماهنگی کلی بین روش‌های دسته‌بندی، مقدار ضرایب اتورگرسیون AR در تمام روش‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است (۱۹).

جدول ۲) مقادیر اتورگرسیون برای مجموعه داده‌های آنالیز شده (کل مجموعه n=۶۱)

SCCmec	Spa	ST	Dru	
			۰/۳۴۲	ST
		۰/۶۵۳	۰/۳۷۹	spa
	۰/۴۲۵	۰/۵۰۵	۰/۲۶۳	SCCmec
۰/۱۲۸	۰/۰۹۰	۰/۱۴۱	۰/۱۴۰	PFGE

بحث

هنگام مقایسه‌ی روش‌های ملکولی مختلف، مهم است که بدانیم و در نظر داشته باشیم که هر روش دقیقاً چه منطقه‌ای از ژنوم را ارزیابی می‌کند. آنالیز PFGE به کل کروموزوم بر اساس مجموع سایز قطعات محدود شده نگاه می‌کند و از این رو تغییرات ژنتیکی ناچیز ممکن است تشخیص داده نشوند. در مقابل، روش‌های مبتنی بر PCR، یک ناحیه به خصوص از کروموزوم را در محل تعیین شده تشخیص می‌دهند. بنابراین تغییرات ژنتیکی کوچکی که این محدوده را تحت تأثیر قرار می‌دهد را تشخیص می‌دهند. اما اگر تغییر خارج از محدوده‌ی تقویت شده رخ دهد، تشخیص داده نخواهد شد (۲۰).

استفاده از شاخص تنوع سیمپسون (SID) به‌عنوان یک مقیاس جهت تمایز روش‌های طبقه‌بندی مختلف، طبقه‌بندی dru و PFGE را به‌عنوان روش‌هایی با بیشترین تمایز تعیین نمود. این نتیجه با نتیجه‌ی کوکسون (Cooksen) و همکاران مطابقت دارد بدین‌صورت که وقتی PFGE (تمایز ۹۹/۵ درصد) با طبقه‌بندی‌های Spa، MLST و SCCmec که همگی سطح پایین‌تری از تمایز را بین ۸۸/۷ تا ۹۱/۳ درصد را ارائه دادند، مقایسه شد، بیشترین قدرت تمایز را از خود نشان داد (۲۱). این نتایج فایده‌ی طبقه‌بندی dru را برای آنالیز اپیدمیولوژیکی، خصوصاً برای رده‌های رایج MRSA حمایت می‌کند. همچنین بر مبنای نتایج این تحقیق در حالی که سوش‌های ST۲۲، ۳ خوشه PFGE را نتیجه می‌دهد که در هر خوشه شباهت تایپ‌های dru وجود دارد، در دو نمونه با ۲ تایپ Spa مختلف، dru مشابهی یافت گردید. این بیانگر ثبات و محافظه کاری ناحیه‌ی dru می‌باشد که با روش تیپ‌بندی PFGE نیز مطابقت دارد و احتمالاً به دلیل موارد نادر نوترکیبی در ژن spa از استافیلوکوکوس اورئوس نیز می‌تواند باشد (۱۶).

ایزوله‌های ST۷، ST۱۸۸ و ST۱ در تایپ‌های Spa، dru و PFGE مشابهی تقسیم شدند، به‌جز ST۷، که ۴ تایپ PFGE را نشان داد که ممکن است از نظر اپیدمیولوژی در تحقیقات آینده مفید باشد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

شکل ۲) تیپ‌بندی مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین

SCCmec	Dru	SPA	MLST	PFGE	NO
Ivh	dt10a	t3213	ST22	A	۱
IVh	dt10a	T032	ST22	A	۲
IVh	dt10a	T032	ST22	A	۳
IVh	dt10a	T4184	ST22	B	۴
IVh	dt10rn	T032	ST22	C	۵
IVh	dt10rn	T032	ST22	C	۶
V	dt14c	T189	ST188	D	۷
V	dt14c	T189	ST188	D	۸
III-A	dt11aa	T037	ST239	D	۹
V	dt14c	T189	ST188	D	۱۰
V	dt14c	T189	ST188	D	۱۱
V	dt14c	T189	ST188	E	۱۲
V	dt14c	T189	ST188	E	۱۳
V	dt14c	T189	ST188	E	۱۴
IIIA	dt13d	T421	ST239	F	۱۵
III	dt13l	T037	ST239	F	۱۶
IIIA	dt13d	T037	ST239	F	۱۷
III	dt13d	T4150	ST239	F	۱۸
III-A	dt13e	T037	ST239	F	۱۹
IIIA	dt13d	T037	ST239	F	۲۰
IIIA	dt13e	T037	ST239	F	۲۱
IIIA	dt13d	T037	ST239	F	۲۲
IIIA	dt1a	T037	ST239	F	۲۳
IIIA	dt13j	Non typeable	ST239	F	۲۴
IIIA	dt13d	T421	ST239	G	۲۵
IIIA	dt13b	T421	ST239	G	۲۶
IIIA	dt13d	T037	ST239	G	۲۷
IIIA	dt9w	T037	ST239	G	۲۸
V	dt9v	T127	ST1	G	۲۹
V	dt9v	T127	ST1	G	۳۰
III-A	dt13g	T037	ST239	G	۳۱
III-A	dt11aa	T037	ST239	G	۳۲
V	dt11a	T091	ST7	G	۳۳
III-A	dt13g	T037	ST239	G	۳۴
V	dt9v	T127	ST1	G	۳۵
V	dt9v	T127	ST1	G	۳۶
III-A	dt13d	T037	ST239	H	۳۷
III-A	dt13d	T037	ST239	H	۳۸
III	dt12g	T4213	ST239	I	۳۹
V	dt9v	T127	ST1	I	۴۰
III	dt13d	T037	ST239	I	۴۱
III-A	dt15e	T037	ST1283	I	۴۲
III-A	dt13d	T037	ST239	I	۴۳
III-A	dt13e	T037	ST239	J	۴۴
III	dt14d	T037	ST239	K	۴۵
III	dt14b	T037	ST239	K	۴۶
III	dt12h	T037	ST239	K	۴۷
III-A	dt13d	T037	ST239	L	۴۸
III-A	dt13g	T138	ST239	L	۴۹
III-A	dt13g	T138	ST1283	L	۵۰
III	dt14c	T037	ST239	L	۵۱

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

SCCmec	Dru	SPA	MLST	PFGE	NO
V	dt9v	T127	ST1	L	۵۲
V	dt14c	T189	ST188	L	۵۳
V	dt14c	T189	ST188	L	۵۴
III	dt13d	T037	ST239	L	۵۵
V	dt9v	T127	ST1	L	۵۶
V	dt9v	T127	ST1	L	۵۷
V	dt9v	T127	ST1	L	۵۸
V	dt11a	T091	ST7	M	۵۹
V	dt11a	T091	ST7	N	۶۰
V	dt13d	T091	ST7	O	۶۱

dt۱۳d به‌عنوان تیپ غالب همان‌طور که انتظار می‌رفت به‌خوبی در سرتاسر بیمارستان پراکنده شده است، اما جالب توجه است که اکثر ایزوله‌های تنفسی از این گونه بودند. به هرحال وابستگی ویژه‌ی dt۱۳d با عفونت‌های تنفسی نیازمند اعتبارسنجی است که با استفاده از تعداد بیشتر نمونه به‌دست می‌آید.

جهت ارزیابی مشابهت کلی روش‌های طبقه‌بندی، ارزش ضریب AR برای همه‌ی روش‌های طبقه‌بندی تجزیه و تحلیل شد. برای همه‌ی مجموعه‌ی جداسازی شده، بالاترین ارزش AR برای طبقه‌بندی Spa و MLST یافت شد (۰/۶۵) و بنابراین تیپ‌بندی بر مبنای MLST یا تیپ‌بندی بر مبنای Spa مقیاس یکسانی از زمینه ژنتیکی را فراهم می‌کند. همه‌ی روش‌های دیگر و ترکیب این روش‌ها به استثنای پیوند بین ST و SCCmec ارزش AR کمتر از ۰/۵ را نشان دادند.

عدم وجود توافق کلی بین روش‌های دسته‌بندی (کمتر از ۸۰ درصد) در سوش‌های MRSA موجود در این مطالعه که عمدتاً به مجموعه‌های بیمارستانی محدود می‌شوند نشان‌دهنده این امر است که فشار آنتی‌بیوتیکی انتخابی سبب بروز سویه‌های مقاوم و تبادل مواد ژنتیکی بین آن‌ها گردیده است و از آنجا که روش‌های گوناگون حوزه‌های مختلف ژنوم را بررسی می‌کنند، سطوح پایین‌تر توافق برای سوش‌های MRSA می‌تواند بیانگر این امر باشد که زیرگونه‌های MRSA کلون‌های پایداری نیستند و نوترکیبی یک رویدادِ بسیار رایج در میان آن‌هاست (۱۶ و ۲۲).

اگر چه PFGE به‌عنوان استاندارد طلایی برای طبقه‌بندی اپیدمیولوژیکی پاتوژن‌های مشکل‌ساز بیمارستانی در نظر گرفته می‌شود، برای MRSA، استفاده از روش‌های اضافی مانند طبقه‌بندی SCCmec و روش‌های مبتنی بر توالی سنجی مانند طبقه‌بندی MLST و Spa نیز افزایش پیدا کرده است. به هر حال، برای سوش‌هایی در کلون‌های خاص مانند EMRAS-۱۵ و EMRSA-۱۶ در بریتانیا، طبقه‌بندی dru روشی را بیان می‌کند که می‌تواند تمایز واقعی را برای این چنین ایزوله‌هایی فراهم کند. به‌تازگی اسمیت (Smyth) و همکاران سودمندی طبقه‌بندی dru در ترکیب با آنالیز توالی ژن SCCmec ccr را جهت فراهم کردن اطلاعات مربوط به ساختار جمعیت کلی MRSA ST۲۳۹ را اثبات کردند (۲۳). به هرحال، مطالعه اسمیت ایزوله‌ها را از نقطه نظر اپیدمیولوژیکی ارزیابی نکرد و فقط ۲ تایپ از ۷ تایپ dru (dt۱۱a، dt۱a) در ۱۳ ایزوله‌ی آسیایی مورد بررسی قرار گرفته یافت شدند که البته در تحقیق حاضر در ۱۹ تایپ dru دیده شدند. علیرغم بالا بودن قدرت تمایز این روش باید بر این نکته نیز اذعان داشت که این روش برخلاف روش‌های دیگر مانند MLST و Spa قادر به

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

طبقه‌بندی استافیلوکوک اورئوس‌های حساس به متی‌سیلین نیست.

از نتایج ارائه شده در این تحقیق می‌توان این گونه نتیجه‌گیری نمود که اگر چه روش‌های مبتنی بر باندهای الکتروفورزی مانند الکتروفورز در ژل با میدان الکتریکی ضربان‌دار یا حتی بررسی تنوع کاست کروموزومی mec نتایج ارزشمندی در مطالعات ژنتیک به جای می‌گذارند ولی روش‌های جدیدتر که بر پایه سکانس نوکلئوتیدی استوار می‌باشند دارای قدرت تمیز بالاتر بوده و به‌ویژه این تحقیق بر سودمندی طبقه‌بندی dru جهت تمایز اپیدمیولوژیکی سوش‌های MRSA مانند ST۲۳۹ تأکید می‌کند و کاربردی بودن این روش را به‌عنوان یک ابزار جهت بررسی اپیدمیولوژیکی MRSA تصریح می‌کند.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکاران در بخش میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه پوترا مالزی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند قدردانی می‌گردد.

References:

1.Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3926-34.
2.Goetghebeur M, Landry PA, Han D, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a public health issue with economic consequences. Can J Infect Dis Med microbiol 2007; 18: 27-34.
3.Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, et al. How clonal is Staphylococcus aureus? J Bacteriol 2003; 185: 3307-16.
4.Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 1-46.
5.Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet Infect Dis 2002; 2: 180-9.
6.Ghaznavi-Rad E, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Shamsudin MN, et al. Environmental Contamination in the Hospital as a Possible Source for Nosocomial Infection with Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31: 1302-3.
7.Van Belkum A, Van Leeuwen W, Kaufmann ME, et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. J Clin Microbiol 1998; 36: 1653-9.
8.Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-9.
9.Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2155-61.
10.Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, et al. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 222-35.
11.Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of Staphylococcus aureus strains. J Clin Microbiol 1999; 37: 3556-63.
12.Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 2000; 38: 1008-15.
13.Nahvi MD, Fitzgibbon JE, John JF, et al. Sequence analysis of dru regions from methicillin-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcal isolates. Microb. Microb Drug Resist 2001; 7: 1-12.
14.Goering RV, Morrison D, Al-Doori Z, et al. Usefulness of mec-associated direct repeat unit (dru) typing in the epidemiological

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

analysis of highly clonal methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Scotland. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 964-9.
15.Aires-de-Sousa M, Boye K, de Lencastre H, et al. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study J Clin Microbiol 2006; 44: 619-21.
16.Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, et al. spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro-and macrovariation. J Clin Microbiol 2004; 42: 792-9.
17.Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, et al. A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed SCCmec types in methicillin resistant Staphylococcus aureus. J Med Microbiol 2010; 59: 1135-9.
18.Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, et al. Predominance and Emergence of Clones of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Malaysia. J Clin Microbiol 2010; 48: 867-72.
19.Robinson DA, Hollingshead SK, Musser JM, et al. The IS 1167 Insertion Sequence Is a Phylogenetically Informative Marker Among Isolates of Serotype 6B Streptococcus pneumoniae. J Mol Evol 1998; 47: 222-9.
20.Singh A, Goering RV, Simjee S, et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 512-30.
21.Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureusstrains: the HARMONY collection. J Clin Microbiol 2007; 45: 1830-7.
22.Kim JY. Understanding the evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Newsletter 2009; 31: 17-23.
23.Smyth DS, McDougal LK, Gran FW, et al. Population structure of a hybrid clonal group of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST239-MRSA-III. PLoS ONE 2010; 5: e8582.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]

ISMJ 2014; 17(3): 326-335

Original Article

Comparison of molecular methods in epidemiological typing of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus

E. Ghaznavi-Rad [*1], A. Amouzandeh nobaveh [1]

[1]Department of Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

(Received 30 May, 2012 Accepted 25 Jul, 2012)

Abstract

Background: The aim of present study was evaluation and comparison of widely used molecular techniques including pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multi locus sequence typing (MLST), Staphylococcus aureus protein A typing (spa), Staphylococcal Cassette Chromosome typing (SCCmec), and SCCmec typing with recently introduced method using direct repeat unit (dru) sequencing in the hyper-variable region of the SCCmec cassette for clustering and discrimination of MRSA isolates.

Material and Methods: Out of 389 already molecularly established methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates 61 representative samples were subjected to PFGE and dru typing methods according to guideline.

Results: The results showed that isolates were typed by PFGE typing, MLST typing, spa typing, SCCmec was typing and dru typing to 7,6,6,12,19 different types respectively. Evaluation of the discriminatory power for each method identified dru typing and PFGE as the most discriminatory methods.

Conclusion: Although the discriminatory ability of dru typing, especially with closely related MRSA ST239 strains underscore its utility as a feasible and cheap method in epidemiological investigation of MRSA, we suggest the use of the conjugation of dru typing and PFGE typing for epidemiological surveillance studies, since this combination provides more discriminatory and typeability which is useful for the control of nosocomial infection.

Key words: Methicillin resistance Staphylococcus aureus, PFGE, dru, molecular typing comparison

Address for correspondence: Department of Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN; E-mail: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir , ghaznaviehs@yahoo.com

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-24]