مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره چهارم (پیاپی ۲۹) زمستان ۱۳۹۵
صفحات ۲۸۵-۲۷۸

Original Article

ژنوتایپینگ جدایه های عفونت های بیمارستانی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با استفاده از روش ترادف یابی چند جایگاهی (MLST)

سارا رفیعی[۱]، الهه تاج بخش*[۲]، حسن ممتاز[۳]

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، [۲]دانشیار، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، [۳]استاد، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد.

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* یکی از اصلی ترین عوامل عفونت مجاری ادراری و دومین عامل عفونت های تنفسی در انسان است. این مطالعه با هدف ژنوتایپینگ جدایه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از عفونت های بیمارستانی و شناسایی کلون های ژنتیکی این باکتری با استفاده از روش ترادف یابی چند جایگاهی (MLST) انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی در ۱۶ جدایه انتخاب شده بیمارستانی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، محصول PCR به دست آمده از تکثیر ۷ ژن خانه دار تعیین توالی گردید. سپس توالی های نوکلئوتیدی هرجدایه در بانک اطلاعاتی MLST آنالیز گردید و علاوه بر تعیین کلون های مختلف، آلل های مربوط به هر ژن در هر کدام از انواع ST- شناخته شده تعیین گردید.

یافته ها: در مجموع ۳ کلون ST22، ST88، ST153 در ۱۶ جدایه مورد مطالعه شناخته شد که در ۲ خوشه ژنتیکی A و B قرار داشتند. کلون های شناسایی شده در جدایه ها به ترتیب ST22 (فراوانی ۵۰٪)، ST88 (۳۱/۲۵٪) و ST153 (۱۸/۷۵٪) بودند. غالب ترین پروفایل شناخته شده در بین ۱۶ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* کلون ST22 شناسایی گردید.

نتیجه گیری: آنالیز دندروگرام حاصل از تایپینگ نشان داد که تمام جدایه های مورد بررسی با آلل های قبلی گزارش شده مشابهت دارند. همچنین نتایج این پژوهش، تنوع ژنتیکی جدایه های مورد بررسی را نشان داد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ژن های خانه دار، کلون های ژنتیکی، ترادف یابی چندجایگاهی.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۵

مقدمه

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*S. epidermidis*)، کوکسی گرم مثبت و کواگولاز منفی در جنس *استافیلوکوکوس* است. این باکتری، بخشی از فلور همزیست پوست انسان است و در مخاط بینی و بخش فوقانی مجاری تنفسی مستقر می‌باشد همچنین در غشای مخاطی بسیاری از جانوران نیز دیده شده است (۱). *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تا مدت‌ها به خاطر طبیعت همه‌جایی و بیماری‌زایی نسبتاً ضعیف به‌عنوان ساپروفیت معرفی می‌شد، اما در دهه‌ها ی اخیر با گسترش استفاده از وسایل پزشکی مصنوعی مورد استفاده در بدن، مانند انواع سوندها و پروتز ها، به‌عنوان یک پاتوژن مهم بیمارستانی ظهور کرده است (۲ و ۳). *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* یکی از شایع‌ترین گونه‌های آلوده کننده محیط‌ها و آزمون‌های آزمایشگاهی است (٤).

در دهه‌ی گذشته، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به‌عنوان سومین عامل عفونت بیمارستانی و یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت خون معرفی شده است. همچنین به دفعات از عفونت های زخم، خون، مجاری ادرار، اندوکاردیت، باکتریمی، ذات الریه، عفونت‌های پوستی و بافت‌های نرم جدا شده است (۵ و ٦).

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۰۰ پست الکترونیک: ee_tajbakhsh@yahoo.com

در طول دو دهه‌ی گذشته، روش‌های تایپینگ مولکولی گسترش پیدا کرده است. این روش‌ها اهمیت بسیار زیادی در شناسایی گونه‌های عفونی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی و تعیین ساختار جمعیت میکروبی و تنوع ژنتیکی درون یک گونه دارد (۷).

روش‌های زیادی مانند پالس فیلد ژل الکتروفورز (PFGE)، هیبریدیزاسیون DNA، RAPD PCR، AFLP، روش های فنوتیپی مانند بیوتایپینگ وسروتایپینگ و هم‌چنین ارزیابی مقاومت به متی سیلین برای طبقه بندی و تشخیص مولکولی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد استفاده قرار گرفته است (۷). یکی از روش‌هایی که در سال‌های اخیر به منظور تایپینگ باکتری‌ها توسعه پیدا کرده است، روش تعیین توالی در چند لوکوس ژنی (MLST= Multilocus sequence typing) است.

در این روش برای مقایسه‌های بین آزمایشگاهی و مطالعات اپیدمیولوژیکی و جمعیتی از یک پایگاه داده استفاده می‌شود (۸ و ۹). MLST یک روش با قدرت تمایز بسیار بالا است که برای آنالیز پلی مورفیسم‌های نوکلئوتیدی در توالی‌های ۷ قطعه داخلی ٤٠٠ تا ٥٠٠ جفت بازی از جایگاه ژن‌های (لوکوس های) مولد آنزیم‌های ضروری انجام می‌شود. در این روش توالی‌های به‌دست آمده از هر لوکوس ژنی، در یک گونه باکتریایی به عنوان یک آلل شناخته می‌شود و آلل‌های به‌دست آمده در هر لوکوس را در مجموع یک پروفایل آللی یا یک سکانس تیپ (ST) می‌نامند (۱۰ و ۱۱).

بنابراین هر جدایه از یک گونه به‌طور آشکار با یک سری شماره های آللی در لوکوس های مختلف یا با یک عدد واحد به عنوان ST شناسایی می‌شود (۱۰). از آن‌جایی که MLST یک روش متکی بر توالی‌های نوکلئوتیدی است و تکنولوژی وابسته به آن به‌طور قابل ملاحظه‌ای از نظر بازدهی و قابلیت اعتماد در دو دهه گذشته پیشرفت کرده است، بنابراین یک روش تایپینگ با قابلیت تکثیر پذیری بسیار بالا همراه با مزایای خیلی زیاد از نظر تولید داده های استاندارد می باشد. با استفاده از این روش، تبادل داده های حاصل از تایپینگ مولکولی بین آزمایشگاه ها از طریق اینترنت به آسانی امکان‌پذیر است و موجب توسعه مطالعات اپیدمیولوژیکی در سطح جهان می‌شود. در این زمینه، هم اکنون پایگاه داده ها از طریق اینترنت برای چندین ارگانیسم درسایت www.mlst.net قابل دسترس می‌باشد (۱۱ و ۱۲). مطالعات متعدد محققان در کشورهای اروپایی نشان دهنده کلون های ST22 و ST88 در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* می‌باشد. اما در ایالات متحده آمریکا و ایرلند کلون ST53 شناسایی شده است (۱۲).

هدف از این مطالعه ارزیابی روش MLST به منظور دسته بندی سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها و تعیین سویه های در حال گردش این باکتری می‌باشد.

مواد و روش ها

الف) جدایه‌های باکتریایی: در این مطالعه توصیفی مقطعی، تعداد ١٦ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد انتخاب گردید. به منظور جداسازی این باکتری، نمونه‌های مورد نظر در محیط بلادآگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. سپس با استفاده از روش‌های رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر قندهای گزیلوز، ساکارز، ترهالوز، مالتوز، مانیتول، همولیزین، رشد در شرایط بی‌هوازی در محیط تیوگلیکولات، حساسیت نسبت به نوبیوسین و تست فسفاتاز شناسایی مقدماتی شدند (۱۳).

ب) استخراج DNA و تائید مولکولی جدایه‌های باکتریایی: DNA ژنومی به وسیله کیت استخراج DNA (فرمنتاز، لیتوانی) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* باکتری و تائید قطعی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در جدایه های مورد مطالعه، آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با توالی F: 5'-CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG-3' و R: 5'-CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG-3' انجام

شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم)، ۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۲ میلی مول dNTPs (10 mM) (فرمنتاز-لیتوانی)، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ (50 mM)، ۱ میکرومول از هر پرایمر (سیناژن، ایران)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاس، لیتوانی) انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳٦ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به‌مدت ٤٥ ثانیه، اتصال در دمای ٦٦ درجه سلیسیوس به‌مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای۷۲ درجه سلیسیوس به‌مدت ۱ دقیقه انجام شد (١٤). محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند.

ج) آزمون MLST: به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از عفونت‌های بیمارستان از روش MLST و مطابق با دستورالعمل توصیه شده در سایت www.mlst.net استفاده شد. در این روش توالی نوکلئوتیدی مربوط به ۷ ژن خانه‌دار (*arcC, aroE, gtr, mutS, pyr, tpi, yqiL*) *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* پس از تکثیر درآزمایش PCR، تعیین توالی گردید و توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده برای ۷ ژن مربوط به هر جدایه با توالی‌های قبلی ثبت شده در این سایت مقایسه و ضمن تعیین شماره آللی مربوط به هر ژن، ST مربوط به هر جدایه تعیین گردید. برای این منظور از زوج پرایمرهای معرفی شده در سایت رسمی MLST (جدول ۱) استفاده گردید (١٤). تکثیر هر کدام از ژن‌های یاد شده به صورت جداگانه (در قالب PCR معمولی) در حجم۵۰ میکرولیتر متشکل از ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۲ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومول dNTP mix، ۱ میکرومولار از هر جفت پرایمر مربوط به هر ژن، ۱ واحدآنزیم Taq DNA Polymerase و ۲ میکرولیتر نمونه‌های تخلیص شده DNA (۱۰۰ نانوگرم) صورت گرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده به منظور تکثیر ژن‌های خانه‌دار با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳٦ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه انجام شد (١٤).

د) خالص سازی محصول PCR و تعیین توالی: محصولات PCR با استفاده از کیت (PCR Clean up Vivantis, Malasia) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص گردیدند. نمونه‌های تخلیص شده جهت تعیین توالی ژن‌های تکثیر یافته در هر جدایه به شرکت ماکروژن کره ارسال و با استفاده از دستگاه ABI3730 XL و روش سانگر(Sanger) تعیین توالی شدند.

ه) تعیین شماره آلل های ژن های خانه دار: توالی نوکلئوتیدی مربوط به هر ژن خانه‌دار توسط نرم افزار Chromas مورد

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ۷ ژن خانه دار در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*.

نام ژن	فعالیت	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه قطعه (جفت باز)
arcC	Carbamate kinase	TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG	٤٦٥
aroE	Shikimate dehydrogenase	CATTGGATTACCTCTTTGTTCAGC CAAGCGAAATCTGTTGGGG	٤٢۰
gtr	ABC transporter	CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT GTGATTAAAGGTATTGATTTGAAT	٤٣٨
mutS	DNA mismatch repair protein	GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT	٤١٢
pyr	Pyrimidine operon regulatory protein	GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA	٤٢٨
tpi	Triosephosphate isomerase	ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC TTAATGATGCGCCACCTACA	٤٢٤
yqiL	Acetyl-CoA acetyltransferase	CACGCATAGTATTAGCTGAAG CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA	٤١٦

بررسی و اصلاح (Trim) قرار گرفت. در قسمت آنالیز داده (Data analysis) از سایت MLST گزینه دانلود آلل (Download allel) انتخاب و توالی مورد نظر با توالی آلل‌های ثبت شده در سایت مقایسه و اصلاحات لازم انجام گرفت.

به منظور تعیین شماره آلل ها، توالی های اصلاح شده در قسمت Locus Query بخش Single Locus وارد و شماره آلل های مربوط به هر ژن تعیین گردید. پس از تعیین شماره آلل‌های مربوط به هر ژن، شماره آلل های مربوط به ۷ ژن خانه دار *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* یعنی ژن های *arc*، *aro*، *pyr*، *mut S*، *gtr*، *tpi*، *yqi* در قسمت Profile Query Allelic وارد و ST مربوط به هر جدایه تعیین گردید.

و) بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها: ارتباط فیلوژنتیکی بین جدایه‌ها توسط الگوریتم eBURSTv3 سایت (http://eburst.MLST.net) بررسی گردید. با استفاده از نرم افزار GelClust و بر اساس روش ماتریکس فاصله طبق مدل UPGMA، الگوی توالی یابی تایپ‌های به‌دست آمده آنالیز و دندروگرام الگوی کلاسترینگ به دست آمده از مجموع کلون‌ها ترسیم گردید.

یافته ها

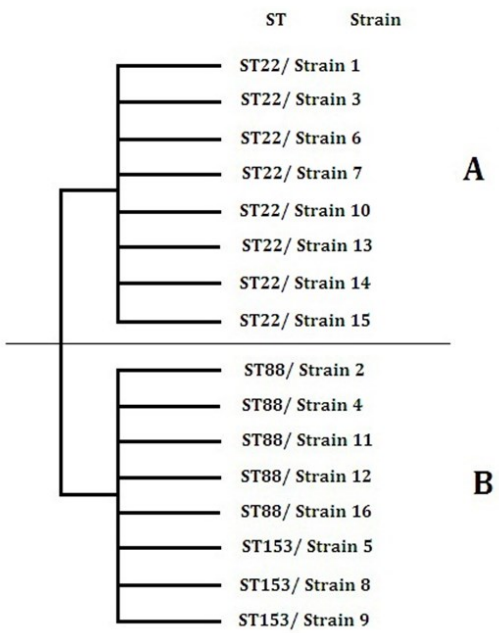
در ۱۶ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد بررسی ۳ پروفایل ژنتیکی (کلون=ST) شامل ST22، ST88، ST153 شناسایی شد. نتایج حاصل از بررسی توالی یابی و شماره آلل‌های موجود در ST های شناخته شده در ۷ ژن خانه‌دار از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی ST های شناخته شده در ۱۶ جدایه مورد بررسی در جدول ۳ آورده شده است. همان گونه که در این جدول مشخص است، کلون ST22 با فراوانی ۵۰ درصد غالب‌ترین پروفایل شناخته شده در ۱۶ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد مطالعه بود. ارتباط فیلوژنی بین جدایه‌ها توسط الگوریتم eBURSTv3 از سایت htpp://eburst.MLST.net بررسی شد. بر اساس الگوی توالی یابی تایپ به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار GelClust و روش ماتریکس فاصله طبق مدل UPGMA آنالیز و دندروگرام الگوی کلاسترینگ به دست آمده از مجموع کلون‌ها رسم گردید. این ۱۶ جدایه در دو کلاستر A و B قرار گرفتند (شکل ۱).

جدول ۲: الگوی آلل های مختلف ژن های خانه دار در انواع ST جدایه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*.

ST	الگوی آلل ها						
	arc C	*aroE*	*gtr*	*mutS*	*pyr*	*tpi*	*yqiL*
ST22	۷	۱	۲	۲	٤	۷	۱
ST88	۱	۱	۲	۱	۲	۱	۷
ST153	۲	۱	٦	۲	۲	۱	۱

جدول ۳: کلون های ژنتیکی غالب شناخته شده در ۱۶ جدایه ی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*.

کلون ST	تعداد جدایه	فراوانی (درصد)
ST22	۸	۵۰
ST88	۵	۳۱/۲۵
ST153	۳	۱۸/۷۵



شکل ۱: دندروگرام جدایه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بر اساس ST.

بحث

امروزه در مطالعات اپیدمیولوژیکی و جمعیتی روش MLST کاربرد ویژه‌ای پیدا نموده است. با روش های تایپینگ مولکولی

می توان شیوع عفونت های بیمارستانی، شناسایی مخازن آلودگی ناشی از غذا یا انتشار سویه های پاتوژنیک گیاهی در محیط را مشخص نمود (۱۰ و ۱۳).

در مطالعه حاضر از این روش جهت دسته‌بندی ژنتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* استفاده شده است. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی بوده که امروزه نسبت به اکثر آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های میکروبی مقاوم شده است. در این مطالعه ۱۶ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جداشده از عفونت های دستگاه ادراری به روش MLST آنالیز شد و ۳ کلون مختلف شامل ST22، ST88 و ST153 در بین جدایه ها شناخته شد که غالب ترین کلون ST22 بود.

در مطالعات قبلی انجام شده در دنیا ST22 بیشتر در کشورهای اروپایی (ایسلند، دانمارک، یونان و آلمان) و ایالات متحده آمریکا و ST88 نیز از کشورهای اروپایی (لهستان، دانمارک و پرتغال) و ST153 از ایالات متحد امریکا و یک کشور اروپایی به نام ایرلند جداسازی و شناسایی شده اند (۱٤).

طبق اطلاعات ما، تا کنون از روش MLST جهت تایپینگ *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در ایران استفاده نشده است. اما در نقاط مختلف دنیا مطالعاتی درخصوص ژنوتایپینگ *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به این روش انجام گرفته است. به عنوان مثال در تحقیق انجام شده توسط شارما (Sharma) و همکاران در سال ۲۰۱٤، که با روش MLST بر روی ۱۰۰ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* صورت گرفت، کلون ST44 در ۱۰۰ جدایه، ST2 در ۳۵ جدایه و ST5 در ۱٤ جدایه شناسایی گردید. در این تحقیق کلون ST44 غالب‌ترین کلون معرفی گردید، اما در تحقیق حاضر کلون ST22 غالب ترین کلون معرفی گردید (۸).

کریفی (Cherifi) و همکاران در سال ۲۰۱٤، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* را از ۲۰ بیمار مبتلا به عفونت‌های خونی وابسته به کاتتر و ٤۲ کارمند همان بیمارستان جداسازی کردند. در پژوهش یاد شده با استفاده از روش MLST در مجموع یازده ST شناسایی گردید. ST2 در ۸ جدایه و ST54 در ۳ جدایه یافت شد که با نتایج حاصل ار تحقیق حاضر تفاوت دارد (۱۵).

در تحقیق پائولو (Paulo) و همکاران در سال ۲۰۱۳، از ۳۰ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تعداد دوازده ST مختلف شناسایی شد. در این بررسی کلون جدید ST493 شناسایی گردید. رایج ترین انواع ST در این مطالعه ST59 (۹ مورد)، ST6 (٤ مورد)، ST5 (٤ مورد)، ST20 (۳ مورد)، ST81 (۳ مورد) بود. همچنین شش ST دیگر نیز شامل ST2، ST35، ST57، ST174، ST179 و ST198 نیز معرفی گردیدند. اما در پژوهش یاد شده کلون های ST22، ST88 و ST153 شناسایی نگردید (۱٦).

در تحقیق مندس (Mendes) و همکاران در سال ۲۰۱۲، از ۷۱ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد بررسی ۲۷ نوع ST مختلف را گزارش نمودند. ST2 (۱٦/۹درصد) و ST5 (۲۱/۱ درصد) کلون‌های غالب بودند. همچنین ST83 (۹/۹ درصد) و ST7 (۵/٦ درصد)، ST59 (۷ درصد) و ST7 (۵/٦ درصد) نیز کلون های شناسایی شده بودند (۱۷).

در طی تحقیق لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۸۰ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تعداد شانزده ST شناسایی شد که ۷۵ درصد آن‌ها در ٦ گروه ST2، ST5، ST66، ST23، ST6 و ST20 قرار داشتند. هم‌چنین سه مورد از انواع ST مربوط به یک جدایه بود وهفت نوع دیگر STمربوط به دو تا سه جدایه بودند. اما ST2 به‌عنوان غالب‌ترین مورد گزارش گردید (۱۸).

در پژوهش حاضر تمامی انواع شناسایی شده ST با موارد شناخته قبلی ثبت شده در بانک اطلاعاتی MLST مطابقت داشتند و در دو کلاستر A و B قرار گرفتند. این امر نشانگر وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی در این جدایه ها می باشد.

نتیجه گیری

قرار گرفتن جدایه‌های مورد مطالعه در کلاستر های جداگانه نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی می باشد. این مسئله می تواند احتمال آلودگی افراد به *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* را از منابع مختلف عفونت‌های بیمارستانی (از ابزار و وسایل گرفته تا هوای اتاق) را نشان دهد. بنابراین به نظرمی‌رسد با جداسازی باکتری

از بخش‌های مختلف بیمارستان، می‌توان تنوع جدایه‌ها با روش‌های نوین مولکولی مانند MLST را مورد ارزیابی قرار داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای مهندس منوچهر مومنی به دلیل همکاری در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Najar Peerayeh Sh, Jazayeri M, Behmanesh M. Prevalence of virulence related determinants in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Jundishapur J Microbiol. 2016; 9(8): e30593.

2. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A, Camargo CH, Cunha Mde L. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109(7): 871-878.

3. Vuong Liduma I, Tracevska T, Bers U, Zilevica A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. Medicina (Kaunas). 2012; 48(6): 305-309.

4. Halverson S, Malani P, Newton DW, Habicht A, Younger G. Impact of hourly emergency department patient volume on blood culture contamination and diagnostic yield. J Clin Microbiol. 2013; 51(17): 1721-1726.

5. Zimmerli A, Trampuz E, Ochsner F. Prosthetic-joint infections. New Eng J Med. 2004; 351 (16): 1645-1654.

6. Ebrahimzadeh Namvar A, Bastarahang S, Abbasi N, Sheikhi Gh, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, Hosseini M, Zaeemi S, Jokar Z, Ganji Chermahin S. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. GMS Hygiene Infect Control. 2014; 9(3): 1-10.

7. Wang XM, Noble L, Kreiswirth BN, Eisner W, McClements W, Jansen KU, Anderson AS. Evaluation of a multilocus sequence typing system for *Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol. 2003; 52(11): 989-998.

8. Sharma P, Satorius AE, Raff MR, Rivera A, Newton DW, Younger JG. Multilocus sequence typing for interpreting blood isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2014; 2014:787458. doi: 10.1155/2014/787458.

9. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Oiha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of *Staphylococcal* infection. J Clin Microbiol. 2001; 39(9): 3332-3338.

10. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 2003; 11(10): 479-487.

11. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol. 1999; 7(12): 482-487.

12. Larsen V, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H. Multilocus sequence typing of total genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol. 2012; 50(4): 1355-1361.

13. Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, Lencastre H. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. J Clin Microbiol. 2008; 46(1): 118-129.

14. Cunha Mde L, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase negative *Staphylococc*i. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004; 99(8): 855-860.

15. Cherifi S, Byl B, Deplano A, Nagant C, Nonhoff C, Denis O, Hallin M. Genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter related bloodstream infections and from colonized healthcare workers in a Belgian hospital. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014; 25(4): 13-20.

16. Paulo JM, Hofling lima A, Pigntari CC. Characterization of ocular methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates belonging predominantly to clonal complex subcluster II. J Clin Microbiol. 2013; 52(5): 1412-1417.

17. Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrell DJ. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis*clinical isolates from U.S. Hospitals. Antimicrob Agent Chemother. 2012; 56(9): 4651-4661.

18. Li M, Wang X, Gao Q, Lu Y. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. J Med Microbiol. 2009; 58(4): 456-461.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 4, January 2017

Original Article

Genotyping of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from nosocomial infections by Multilocus Sequence Typing (MLST)

Sara Rafee[1], Elahe Tajbakhsh[2], Hassan Momtaz[3]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Shahrekord branch,Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2]Associated Professor, Department of Microbiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[3]Professor, Department of Microbiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Staphylococcus epidermidis* is one of the main causes of urinary tract infections and second cause of respiratory infections in human. The aim of this study was genotyping *S. epidermidis* strains isolated from nosocomial infections and detection of genetic clones using Multilocus Sequence Typing (MLST) method.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 16 *S. epidermidis* isolates were selected and PCR products from amplification of seven housekeeping genes were sequenced. The nucleotide sequences of each gene in each isolate were analyzed in the MLST database and, besides identifying different clones, gene - specific alleles in each sequence types (ST) were determined.

Results: A total of 3 clones including ST22, ST88 and ST153 were identified from 16 isolates, which was classified into two gene clusters of A and B. ST22 clone with a frequency of 50%, ST88 with 31.25% and ST153 with 18.75% were identified. The most dominant *S. epidermidis* clone isolated in 16 isolates is ST22.

Conclusion: Dendrogram analysis of the isolates showed the homology of all isolates to alleles previously reported. Furthermore, our results suggest the genetic diversity of the isolates.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, Housekeeping genes, Genetic clones, Multilocus Sequence Typing (MLST).

Correspondence to: Elahe Tajbakhsh

Tel: +98 3833361000

E-mail: ee_tajbakhsh@yahoo.com

Journal of Microbial World 2017, 9(4): 278-285.