Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 18, No. 3, Autumn 2018, Pages 377-386

Molecular Detection of *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *S. hominis* Isolated from the Neonatal Umbilical Cord by Multiplex PCR Method

Kasavandi A[1], Bikhof Torbati M*[1], Amini K[2]

1. Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini(RAH) Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

**** Corresponding author.*** Tel: +982155229101, Fax: +982155229369, E-mail: maryam.bikhof@gmail.com, bikhof@iau.ac.ir

Received: May 20, 2018 Accepted: Aug 21, 2018

ABSTRACT

Background & objectives: Staphylococci are considered as one of the most important etiological agents of omphalitis. Due to the importance of early diagnosis of omphalitis in newborns, this infection can be diagnosed by novel techniques such as multiplex PCR which is rapid, cost- effective and more accurate than microbial culture. The aim of this study was to determine the frequency of *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *S.hominis* species in umbilical cord infection in newborns.

Methods: In the present study, 45 umbilical cord samples were collected from Shahid Afzali pour hospital in Kerman, Iran. Followed by DNA extraction, Multiplex PCR reactions were performed using specific 16srDNA primers for *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S.hominis*. Finally, PCR products were analyzed using electrophoresis and sequencing. Also, microbiological and biochemical differentiation tests were performed for the diagnosis of Staphylococci on all specimens.

Results: Amplification of 16srRNA genes for *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *S. hominis* using Multiplex PCR demonstrated that the frequency of *S. epidermidis* ,*S. aureus* and *S.hominis* were 4.4%, 6.6% and 2.2% in the studied samples, respectively. The prevalence of staphylococcal isolates using differential tests was shown to be 33.3%.

Conclusion: This study indicated that, Multiplex PCR is a proper method for simultaneous identification of S. *aureus*, *S. epidermidis* and *S.hominis* species. Also, Staphylococci can be considered as a significant cause of umbilical cord infection in newborns. However, further studies urgently are needed to confirm this finding.

Keywords: *Staphylococcus*; Neonate; Multiplex PCR; Umbilical Cord

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]

تشخیص مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اس. اپیدرمیدیس* و *اس. هومینیس* در نوزادان مبتلا به عفونت بند ناف با روش PCR چندگانه

آرزو کساوندی[۱]، مریم بی خوف تربتی[۱*]، کیومرث امینی[۲]

۱. گروه زیست شناسی، واحد یادگارامام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۵۵۲۲۹۲۰۱ ۰۲۱، ۰۹۱۲۶۲۳۳۳۶۲ فاکس: ۵۵۲۲۹۳۶۹ ۰۲۱
پست الکترونیک: maryam.bikhof@gmail.com, bikhof@iau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس*ها یکی از عوامل عفونت بندناف هستند. با توجه به اهمیت تشخیص زود هنگام عفونت بندناف در نوزادان می‌توان از روش‌های نوین مانند PCR چندگانه که در مدت زمان کوتاه‌تر و با هزینه کمتر، از کارایی و دقت بیشتری نسبت به کشت برخوردار است، نوع عفونت را تشخیص داد. هدف از این تحقیق، تشخیص و مطالعه فراوانی تیپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اس. اپیدرمیدیس* و *اس. هومینیس* در بین پاتوژن‌های موثر در عفونت بندناف نوزادان بود.

روش کار: در این تحقیق ٤٥ نمونه بندناف نوزادان مبتلا به عفونت بندناف از بیمارستان شهید افضلی پور کرمان جمع‌آوری و بعد از استخراج DNA باکتری، واکنش PCR چندگانه توسط پرایمرهای اختصاصی ژن 16srDNA *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اس. اپیدرمیدیس* و *اس. هومینیس* انجام شد. محصول PCR با روش الکتروفورز آنالیز و تعیین سکانس گردید. همچنین تست‌های افتراقی میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی برای تشخیص *استافیلوکوکوس* بر روی همه نمونه‌ها انجام شد.

یافته‌ها: تکثیر ژن 16srDNA به روش PCR چندگانه نشان داد که فراوانی گونه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *اس. اورئوس* و *اس. هومینیس* در نمونه‌های مورد مطالعه به ترتیب ۶/۶، ٤/٤ و ۲/۲ درصد می‌باشد. همچنین شیوع جنس *استافیلوکوکوس* با تشخیص افتراقی، ۳۳/۳ درصد بدست آمد.

نتیجه‌گیری: روش PCR چندگانه برای تشخیص همزمان هر سه نوع باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اس. اپیدرمیدیس* و *اس. هومینیس* کارآمد می‌باشد. همچنین *استافیلوکوکوس*ها می‌توانند یکی از عوامل عفونت بند ناف نوزادان باشند. هرچند، اثبات دقیق آن نیازمند مطالعات وسیع‌تر و داشتن گروه کنترل است.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس، نوزادان، PCR چندگانه، بند ناف

دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۳۰ **پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۵/۳۰

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]

مقدمه

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالانه چهار میلیون کودک در دوران نوزادی به علت عفونت فوت می‌کنند که حدود یک میلیون آنها مبتلا به عفونت بند ناف بوده اند. بیشتر این مرگ‌ها در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد[۱]. همچنین برآورد شده که سالانه سیصد هزار نوزاد بر اثر ابتلا به کزاز می‌میرند و مهمترین علت ابتلا به کزاز، عفونت بند ناف

می‌باشد[۲]. عفونت بندناف می‌تواند ناشی از آلودگی به باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و بی هوازی و نیز عفونت‌های قارچی باشد. از جمله مهمترین عوامل باکتریایی پاتوژن که سبب عفونت بندناف می‌گردد، می‌توان به انواع *استافیلوکوکوس*ها و *انتروباکتر*ها، *استرپتوکوک*ها، *کلبسیلا*، *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتر*ها و *اشریشیاکلی* اشاره نمود که در ۲٤ ساعت اول بعد از تولد در بندناف استقرار یافته و گاه به دلیل ناشناخته در ۲ تا ۳ روز اول عمر باعث عفونت بندناف می‌شوند[۳]. عفونت‌های ایجادشده توسط این ارگانیسم‌ها عمدتاً در ارتباط با وسایل خارجی درون بدن بیماران مانند کاتترهای داخل وریدی، شانت‌های مغزی نخاعی، دریچه‌های مصنوعی قلب و مفاصل مصنوعی می‌باشد[٤].

*استافیلوکوکوس*ها از دسته عفونت‌هایی هستند که در بندناف بسیار شایع بوده و از مهمترین آن‌ها میتوان به *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اس. اپیدرمیدیس* و *اس. هومینیس* اشاره کرد. *استافیلوکوکوس اورئوس* باکتری گرم مثبت بوده که به عنوان دومین عامل شایع عفونت بیمارستانی محسوب می‌شود و بخشی از فلور طبیعی پوست و مجاری بینی می‌باشد. این باکتری می‌تواند موجب طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل عفونت‌های پوستی، مسمومیت غذایی، پنومونی، سپتی‌سمی، اندوکاردیت، آبسه‌های مغزی، انتروکولیت استافیلوکوکی و سندرم شوک سمی شود. این ارگانیسم به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشد. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نیز از جمله *استافیلوکوکوس*های کواگولاز منفی است و نیز فراوان‌ترین گونه باکتری در پوست انسان و پایدارترین باکتری در برخی نواحی بدن است. روی پوست انسان نیز به میزان زیادی مستقر است. همچنین به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های مرتبط با وسایل پزشکی شناخته می‌شود[۵]. از آن جایی که بخش عمده ای از کارکنان شاغل در بیمارستان‌ها حامل این باکتری در پوست و قسمت بینی خود هستند می‌توانند آن را به راحتی به سایرین منتقل کنند[۶]. باکتری *استافیلوکوکوس هومینیس* نسبت به سایر گونه‌های مورد بررسی *استافیلوکوکوس* از اهمیت بالینی کمتری برخوردار است ولی در ایجاد عفونت بندناف نقش دارد[۸،۷].

خون بندناف به طور موفقیت‌آمیزی از سال ۱۹۸۸ به‌عنوان یک منبع سلول‌های بنیادی، جایگزین مناسبی برای سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان و خون محیطی در انجام پیوند برای گیرنده‌های انتخابی خویشاوند و غیرخویشاوند استفاده می‌شود. آلودگی میکروبی خصوصاً آلودگی باکتریایی نمونه‌های ذخیره‌شده، برای افراد گیرنده پیوند با سیستم ایمنی شدیداً سرکوب شده و ضعیف، بسیار مخاطره برانگیز است. گزارش‌ها نشان داده اند که در دو مرحله احتمال آلوده شدن خون بند ناف وجود دارد، یکی ضمن نمونه‌گیری و ارسال آن به آزمایشگاه و دیگری در طی انجام فرایند پردازش، استخراج و ذخیره سازی سلول‌های خونی[۹].

زمان تولد مانند نوزادانی که نارس متولد می‌شوند و نیز قرارگرفتن نوزادان در معرض آلودگی‌های محیطی ضمن تولد یا پس از آن، نظیر باکتری‌های موجود در دستگاه تناسلی مادر، ابزارها، مواد و یا تماس‌های آلوده به عنوان عوامل خطر غیرژنتیک موثر در عفونت بند ناف می‌باشند[۱۰]. بندناف بلافاصله بعد از تولد نکروز شده و این بافت‌های نکروزشده به خودی خود مکانی مناسب برای رشد باکتری‌های استقرار یافته می‌باشد[۱۱]. عفونت بافت بندناف منشاءِ بسیاری از موارد سپتی‌سمی، پریتونیت (التهاب صفاق) و عفونت ارگان‌های داخلی به علت آمبولی‌های سپتیک است[۱۲]. انواع عفونت‌های بیمارستانی از ۱٤/۸ درصد تا ۷۱ درصد در جهان متغیر می‌باشد و میزان بروز این عفونت‌ها در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان از ۵/۹ تا ۳۱/۸ درصد گزارش شده است[۱۳].

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]

یکی از روش‌های تشخیص عفونت‌های باکتریایی، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) است که از حساس‌ترین و دقیق‌ترین آزمایش‌های مولکولی است که می‌تواند برای ردیابی ژن‌های مختلف در نواحی خاصی از مولکول DNA مورد استفاده قرار گیرد[۶]. لوسیگنانو و همکاران با شناسایی عوامل پاتوژن در نمونه‌های نوزادان به روش PCR چندگانه[1]، گزارش کردند که این روش برای تشخیص سریع و دقیق عفونت خون در نوزادان و کودکان مشکوک به سپسیس مناسب است. آن‌ها نشان دادند روش PCR چندگانه از ۸۵ درصد حساسیت و ۹۳/۵ درصد ویژگی در مقایسه با روش کشت برخوردار است[۱٤].

همچنین آندرید و همکاران با مقایسه روش PCR و کشت در شناسایی و جداسازی عوامل پاتوژن گزارش کردند با وجود محدودیت‌های موجود در تشخیص به وسیله PCR، این روش از کارایی و دقت بیشتری نسبت به کشت برخوردار است[۱۵].

بنابراین با توجه به اهمیت تشخیص زود هنگام، سریع و همزمان عوامل ایجاد عفونت بندناف در نوزادان تازه متولد شده جهت استفاده از آنتی بیوتیک‌های مناسب، در این تحقیق، تصمیم بر آن گردید که با طراحی روش مولکولی PCR چندگانه برای ژن‌های rDNA 16s به طور همزمان آلودگی برای سه گونه از باکتری *استافیلوکوکوس (اس. اورئوس، اس. اپیدرمیدیس و اس. هومینیس)* در نمونه‌های عفونت بندناف نوزادان بیمارستان شهید افضلی پور کرمان تشخیص و فراوانی آنها در جمعیت مورد بررسی، تعیین گردد.

روش کار

این مطالعه یک مطالعه توصیفی و تحلیلی از نوع مقطعی بوده و به منظور تشخیص همزمان و سریع *استافیلوکوکوس اورئوس، اس. اپیدرمیدیس و اس. هومینیس* در ٤۵ نمونه بالینی عفونت بندناف نوزاد تازه متولد شده انجام گرفت. مایعات و ترشحات روی نمونه‌های بند ناف، پس از بررسی علائم عفونت نظیر قرمزی و چرک با نظر پزشک توسط سرنگ استریل به صورت خشک و بدون استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها جمع‌آوری، کدگذاری و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها در بازه زمانی مهر ۹۵ تا بهمن ۹۵ بطور تصادفی از بیمارستان شهید افضلی پور کرمان جمع‌آوری شده است. حجم نمونه‌های مورد بررسی بر اساس روش آماری کوکران با سطح اطمینان ۹۵ درصد (α=۰/۰۵) محاسبه گردید.

نمونه‌ها برای شناسایی به محیط کشت بلادآگار[2] (Merck، آلمان) انتقال یافته و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در روز بعد کلونی باکتری‌ها به محیط مایع BHI[3] جهت استخراج DNA منتقل و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند.

به منظور شناسایی مولکولی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اس. اپیدرمیدیس و اس. هومینیس* از نمونه‌های حاصله ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت (سیناژن، ایران) استخراج گردید. غلظت و درجه خلوص DNA استخراج شده بر اساس نسبت میزان جذب $A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermo، آمریکا) ارزیابی شد. جفت پرایمرهای J-StGen/J-StAur ، J-StGen/StEpi و J-StGen (Bioneer/J-StHom ، کره) جهت شناسایی ژن‌های *16SrDNA* به ترتیب سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اس. اپیدرمیس و اس. هومینیس* مطابق جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفت.

[1] Multiplex PCR

[2] Blood Agar

[3] Brain Heart Infusion Broth

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه[۱۶]

نام پرایمر	توالی پرایمر (5´to 3´)	ژن هدف	طول قطعه (bp)
J-StAur (Forward) J-StGen (Reverse)	GGATCTCTTTGTCTGCCG TGGCCAAAAGAGACTATTATGA	*16SrDNA* *استافیلوکوکوس اورئوس*	**337**
J-StEpi (Forward) J-StGen (Reverse)	CCACCAAAGCCTTGACTT TGGCCAAAAGAGACTATTATGA	*16SrDNA* *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	**249**
J-StHom (Forward) J-StGen (Reverse)	TTGACCACTACCCTCACAC TGGCCAAAAGAGACTATTATGA	*16SrDNA* *استافیلوکوکوس هومینیس*	**589**

پس از BLAST پرایمرهای انتخاب شده در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی DNA Taq (0.05mM U/µl) polymerase، $MgCl_2$ (3Mm) و dNTP (0.4Mm)، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف،آلمان) برای ۳۵ سیکل با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید:

گام اول واسرشت ثانویه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۸ درجه برای ٤۰ ثانیه، گام سوم بسط اولیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد (Sigma، آلمان) حاوی ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر اتیدیوم بروماید (Qiagen، آلمان)، الکتروفورز و تحت نور UV با دستگاه ژل داکیومنت (شرکت فراز طوبی نگین، ایران) مشاهده و مستندسازی شدند. محصولات PCR جهت تایید، تعیین توالی گردیدند.

برای تعیین هویت میکروارگانیسم‌ها و تشخیص *استافیلوکوکوس*های رشدیافته روی محیط بلاد آگار، تست‌های استاندارد افتراقی میکروبیولوژی و بیوشیمیایی نظیر رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، تست DNase، تخمیر مانیتول با استفاده از محیط مانیتول سالت آگار[1] و مقاومت به نوبیوسین انجام شد و در نهایت نمونه‌های آلوده به گونه‌های *استافیلوکوکوس* شناسایی قطعی گردیدند.

نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و آزمون‌های آمار توصیفی آنالیز گردیدند و داده‌ها بصورت تعداد (درصد) بیان شدند.

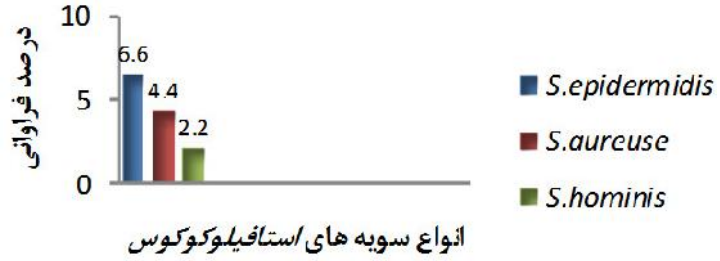
یافته‌ها

نتایج حاصل از تکثیر ژن 16srDNA به روش Multiplex-PCR نشان داد که از ٤۵ نمونه مورد بررسی، مجموعاً تعداد ۶ نمونه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۶/۶٪؛ ۳ع)، *اس. اورئوس* (٤/٤٪؛ ۲ع) و *اس. هومینیس* (۲/۲٪؛ ۱ع) شناسایی شد که بیشترین فراوانی مربوط به *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و کمترین فراوانی مربوط به *استافیلوکوکوس هومینیس* بود (نمودار ۱ و شکل ۱).

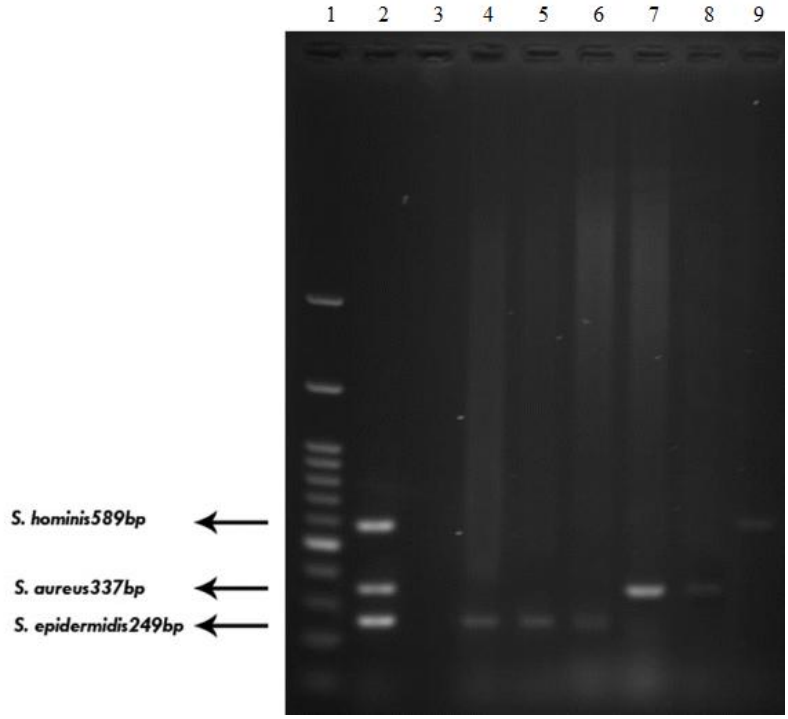
[1] Mannitol Salt Agar

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]



نمودار ۱. توزیع درصد فراوانی سویه‌های مختلف *استافیلوکوکوس* به تفکیک جنس و گونه در نمونه‌های مورد مطالعه (بیمارستان شهید افضلی پور کرمان- مهر۹۵ تا بهمن ۹۵)

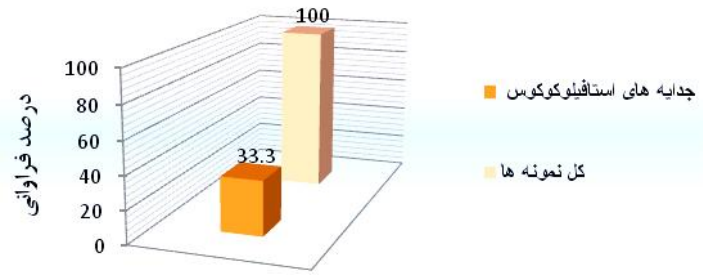


شکل ۱. نتایج تکثیر ژن 16srDNA. به ترتیب چاهک شماره ۱: Ladder (۱۰۰bp)،چاهک شماره ۲: کنترل مثبت،چاهک شماره ۳: کنترل منفی، چاهک‌های شماره ٤ تا۶: باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۲٤۹bp)، چاهک‌های شماره ۷ و۸: باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۳۳۷bp)و چاهک شماره ۹: باکتری *استافیلوکوکوس هومینیس* (۵۸۹bp)

از تعداد ٤۵ نمونه، ۱۵ نمونه با توجه به رنگ‌آمیزی گرم و تست افتراقی کاتالاز، *استافیلوکوکوس* تشخیص داده شدند. بنابراین نتایج نشان داد فراوانی *استافیلوکوکوس*ها در نمونه‌های عفونت بند ناف دریافت شده (۳۳/۳٪، $\frac{۱۵}{٤۵}$) می‌باشد (نمودار ۲). مقایسه سویه‌های *استافیلوکوکوس* که نتایج PCR آنها مثبت شدند با نتایج حاصل از تست‌های افتراقی کواگولاز، مقاومت به نوبیوسین، حساسیت به DNase و تخمیر مانیتول نمونه‌ها نیز نشان داد که تمامی نمونه‌هایی که با روش Multiplex-PCR و پرایمرهای اختصاصی تشخیص جنس و گونه مربوطه، باند 16s r DNA اختصاصی *استافیلوکوکوس اورئوس، اس. اپیدرمیس و اس. هومینیس* را دادند، با روش‌های کشت افتراقی نیز مطابق با استانداردهای تشخیصی تایید گردیدند. لازم به ذکر است نتایج تعیین سکانس قطعات ژنی تکثیرشده 16s r DNA نیز، تایید‌کننده سویه‌های مذکور می‌باشد.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]



نمودار ۲. درصد فراوانی سویه *استافیلوکوکوس* جداشده از نمونه‌های مورد مطالعه (بیمارستان شهید افضلی پور کرمان- مهر۹۵ تا بهمن ۹۵)

بحث

عفونت بند ناف عامل مهم بیماریزایی و مرگ و میر نوزادان در کشورهای در حال توسعه است که میزان شیوع آن بالاتر از ۶ درصد و در کشورهای توسعه‌یافته حدود ۰/۷ درصد ذکر شده است [۱۸،۱۷].

عفونت بندناف می‌تواند ناشی از انواع مختلفی از باکتری‌های گرم مثبت و بی هوازی و نیز عفونت‌های قارچی باشد. این میکروارگانیسم‌ها ممکن است پیامدهای وخیمی نظیر عفونت‌های منتشر به همراه داشته باشند که گاهی به مرگ بیمار می‌انجامد. بنابراین، جدا کردن فوری و تشخیص عوامل عفونت‌زا، یکی از مهمترین اقدامات در نوزادان مبتلا به عفونت بند ناف می‌باشد[۱۹].

برای تشخیص این باکتری‌ها، استفاده از روش‌های کشت متداول و محیط‌های انتخابی و افتراقی و آزمایش‌های بیوشیمیایی و در نهایت سروتایپینگ[1]، زمان‌بر بوده و نیاز به باکتری زنده دارد. بنابراین امروزه سعی بر این است که از روش‌های تشخیصی سریع اما حساس و با اختصاصیت بالا استفاده گردد[۱۹]. در حال حاضر، توسعه روش‌های زیست‌شناسی مولکولی این امکان را فراهم ساخته است که بتوان با این روش‌ها با دقت و سرعت زیاد به شناسایی عوامل بیولوژیک در نمونه‌های بالینی پرداخت. در این بین واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. روش‌های گوناگونی از PCR جهت تأئید عامل بیماریزا مطرح گردیده است[۲۰]. یکی از روش‌های مهم با کارآیی بالا، روش PCR چندگانه است که با استفاده از چند پرایمر در مدت‌زمان کوتاهی می‌توان چند باکتری را بطور همزمان تشخیص داد و در اپیدمی‌های بسیار بزرگ با عوامل بیماریزا، روش بسیار مناسبی با حساسیت و اختصاصیت بالا نسبت به سایر روش‌ها می‌باشد که ضرورت استفاده از آن را دو چندان نموده است. از طرفی ژن‌های متنوعی جهت جستجو و ردیابی یک باکتری خاص در سطح جنس و گونه در آزمون PCR به صورت منفرد و یا توأم مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. از جمله ژن‌هایی که برای تعیین سروتیپ و طبقه‌بندی باکتری‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند می‌توان 16S rDNA را نام برد[۲۱].

در این تحقیق با طراحی روش مولکولی PCR چندگانه تشخیص همزمان و سریع سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اس. اپیدرمیدیس و اس. هومینیس* در بین پاتوژن‌های موثر در عفونت بندناف نوزادان انجام شد و فراوانی هر یک در جمعیت مورد مطالعه گزارش گردید.

در تحقیق حاضر نتایج کشت افتراقی نشان داد که شیوع عفونت ناشی از آلودگی به *استافیلوکوکوس*‌ها ۳۳/۳ درصد در نمونه‌های جمع‌آوری شده بند ناف بود. با توجه به آنکه پرایمرهای مورد استفاده در روش PCR چندگانه برای گونه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اس. اورئوس و اس. هومینیس* اختصاصی

[1] Serotyping

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]
[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]

بودند، لذا فراوانی گونه‌های مذکور در بین کل ٤٥ نمونه عفونت بند ناف جمع‌آوری شده به ترتیب *۶/۶*، ٤/٤ و ۲/۲ درصد و مجموعاً ۱۳/۳ درصد گزارش گردید. درحالی که فراوانی این گونه‌ها در بین انواع مختلف جدایه‌های *استافیلوکوکوس* که سبب عفونت شده بودند، گونه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ٤۰ درصد، گونه *اس. اورئوس* *۲۶/۶* درصد و گونه *اس. هومینیس* ۱۳/۳ درصد بدست آمد. نتایج حاضر نشان داد که روش PCR چندگانه روش مناسبی برای تشخیص سه گونه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *اس. اورئوس* و *اس. هومینیس* در بین عوامل عفونت‌زای باکتریایی بند ناف می‌باشد.

در مطالعه ای که احمدی و همکاران بر روی نمونه‌های خون بند ناف ذخیره شده انجام دادند، آلودگی باکتریایی به *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیاکلی* مشاهده گردید که با مطالعه حاضر همخوانی دارد و نتایج نشان داد که *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اس. اورئوس* را می‌توان به عنوان عوامل موثر در عفونت بند ناف نوزادان در نظر گرفت[۲۲].

در مطالعه حاضر بیشترین شیوع باکتری در بین ۳ گونه *استافیلوکوکوس* مورد مطالعه، مربوط به سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بود.

تفضلی و همکاران با بررسی اثر مصرف موضعی شیر مادر در محل بند ناف نوزادان تازه متولد شده در ۱۵۰ نوزاد نشان دادند بطور معناداری جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیاکلی* در محل بند ناف کلونیزه شدند، بطوری‌که در بین انواع عوامل عفونت‌زای شناسایی شده شیوع باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در هر دو گروه مصرف موضعی شیر مادر و گروه خشک نگه داشته شده مورد بررسی، بیشتر بوده که به نوعی با مطالعه حاضر همسو می‌باشد. اما در مطالعه تفضلی شیوع *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه خشک نگه داشته شده بند ناف که شرایط مشابه با نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق را داشت، به ترتیب ٤۵/۶ و ۳۱/۶ درصد گزارش گردید در حالی که در مطالعه حاضر فراوانی این باکتری‌ها به ترتیب *۶/۶* و ٤/٤ درصد در بین کل نمونه‌های مورد مطالعه بدست آمد و این اختلاف می‌تواند مربوط به حجم نمونه، رعایت مراقبت‌های بهداشتی از نوزادان پس از زایمان و شرایط جمع‌آوری نمونه باشد که شرایط برای کلونیزاسیون باکتری‌ها کمتر مهیا بوده است[۱]. کما اینکه عباس زاده و همکاران طی یک بررسی مشابه با تحقیق تفضلی اما در جمعیتی دیگر، فراوانی کلونیزاسیون میکروارگانیسم‌های پاتوژن مولد عفونت بند ناف را به ترتیب در گروه مصرف موضعی شیرمادر ۲۳/۱ درصد و در روش خشک نگه داشتن بند ناف ۲۸/۸ درصد گزارش کردند که درصد فراوانی عوامل عفونت زا کمتر از گزارش تفضلی بود و از این لحاظ تایید کننده اختلاف موردی نتایج تحقیق حاضر با گزارش تفضلی می‌باشد[۲۳].

بهاندری و همکاران با بررسی نقش بیومارکرها در تشخیص عفونت‌های نوزادان گزارش کردند استفاده از روش‌های نوین مانند PCR در تشخیص زودهنگام عوامل پاتوژن مناسب است که همسو با نتایج حاصل از روش کارامد PCR چندگانه در این تحقیق می‌باشد. *استافیلوکوکوس*های تشخیص داده شده در عفونت نوزادان ناشی از بند ناف به روش PCR در این گزارش ۷ درصد بود[۲٤] که همسو با ۱۳/۳درصد فراوانی سه گونه *استافیلوکوکوس* تشخیص داده شده به روش PCR چندگانه در تحقیق حاضر می‌باشد.

با مقایسه مطالعات سایر محققین در مورد شیوع این باکتری‌ها می‌توان دریافت که فراوانی این باکتری‌ها در هر تحقیقی می‌تواند تا حدودی متغیر باشد که این امر احتمالاً بستگی به جامعه مورد بررسی، تفاوت‌های بین سویه‌ای، تفاوت در روش نمونه‌گیری، ویژگی‌های جغرافیایی، خصوصیات میزبان و بافت مربوط، نوع

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]

زایمـــان و رعایـــت بهداشـــت قبـــل و بعـــد از زایمـــان دارد[۲۵].

این مطالعه با محدودیت‌هایی نیز مواجـه بـود و بـرای تعمـیم شـیوع بـاکتری‌هـا بـه جامعـه انسـانی، پیشـنهاد می‌شود در مطالعات بعدی بررسی وسیع‌تری بـر روی نمونه‌های بیشتر در مناطق جغرافیایی متنوع همراه بـا گروه کنترل انجام گیرد.

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که *استافیلوکوکوس*ها یک عامل خطر در نوزادان مبتلا به بیماری عفونت بند ناف می‌باشند. همچنـین روش PCR چندگانـه یـک تکنیـک سریع، حساس و اختصاصی برای تشخیص 16S rDNA، به عنوان شاخص حضور میکروارگانیسم‌هـای مختلـف، در مقادیر کم یک نمونه است و می‌تواند همزمان هـر سـه نـوع گونـه *استافیلوکوکوس اپیدرمیـدیس، اس. اورئوس و اس. هومینیس را* در نمونه‌های عفونی بنـد ناف شناسایی کند.

تشکر و قدر دانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد است. نویسندگان از حـوزه معاونت پژوهشی دانشـگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امـام خمینـی (ره) شـهر ری جهت حمایت اجرایی در انجـام ایـن تحقیـق نهایـت تقـدیر و تشکر را دارند.

References

1- Taffazoli M, Amiri Farahani L, Mohammadzadeh A, Esmaeeli H, Ghazvini K. Dose topical application of breast milk affect on bacterial colonization in umbilical cord? J Semnan Uni Med Sci. 2008 Feb; 10 (1):29-36. [Full text in Persian].

2- Mullany LC, Darmstadt GL, Khatry SK, Katz J, LeClerq SC, Shresth S, et al. Topical applications of chlorhexidine to the umbilical cord for prevention of omphalitis and neonatal mortality in southern Nepal: a community-based, clusrer-randomized trial. Lancet. 2006 Mar; 367 (9514):910-918.

3- Amirfarahani L, Tafazzoli M, Mohamadzade A. The effect of topical application of human milk on umbilical cord. J Sabzevar Univ med sci. 2006 Oct; 14 (3):165-17. [Full text in Persian].

4- Tanha M, Shojaii Saadi B, Amin K. Antibiotic susceptibility profile and erythromycin resistance genes in the *Staphylococcus epidermidis* strains isolated by Multiplex-PCR. J Babol Univ Med Sci. 2017 Oct; 19 (10):57-61.

5- Alizadeh S, Amin K. Identification of virulence gene panton-valentine leukocidin (*PVL*) and resistance to methicillin (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens: A short report. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2015 May; 4 (5):427-434[Full text in Persian].

6- Tahmasebi H, Bokaeian M, Jahantigh M, Adabi J. Comparing direct PCR and PCR with DNA extraction kits in identifying TST and mecA in *Staphylococcus aureus*. Pars J Med Sci. 2016 Sep; 14 (3):43-51[Full text in Persian].

7- Shokri R, Saloti M, Sorori ZR, Heydari Z. Frequency of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples in Mousavi Hospital, Zanjan, and recognition *mec A* gene using PCR. J microbial word. 2014 Apr;7 (1):58-65. [Full text in Persian].

8- Raad I, Alrahwan A, Rotston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. Clin Infect Dis. 1998 May; 26 (5):1182-1187.

9- Ahmadi MH, Etedali Kh, Ebrahimi M, Samimi S, Mohammad M, Khosh Akhlagh A, et al. Bacterial contamination of umbilical cord blood units intended for the cryopreservation in Royan Cord Blood Bank (2005-2008). Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2009 Winter; 6 (4):257-265. [Full text in Persian].

10- Mullany LC, Darmstadt GL, Katz J, Khatry Sk, Leclerq SC, Adhikari RK, et al. Risk factors for umbilical cord infection among newborns of southern Nepal. AM J Epidemiol. 2006 Jun; 165 (2):203-211.

11- Vural G , Kisa S. Umbilical cord care: A pilot study comparing topical human milk, povidone-iodine, and dry care. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs. 2006 Jan-Feb; 35 (1):123-128.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]

12- Borna H, Jalali Nadoushan MR, Zayeri F, Afshar Hezarkhani L. The effect of alcohol on the cord bacterial colonization in neonates zeinab hospital. J Shahed univ med sci. 2007 Jun;14 (69):19-26.
13- Besharati R, Sadeghiyan A, Mamoori A. Frequency of colonized bacteria and causing septicemia in infants admitted in NICU department of Ghaem hospital in Mashhad. J north khorasan univ med sci. 2011 Spring;3 (1):35-38. [Full text in Persian]
14- Lucignane B, Ranno R, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. J Clin Microbiol. 2011 Jun; 49 (6):2252-8.
15- Andrade S, Bispo PJ, Gales AC. Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. Shock. 2008 Oct; 30 (7):41-6.
16- Moles L, Gomez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. PLoS One. 2013 June; 8 (6):1-13.
17- Sawardekar KP. Changing spectrum of neonatal omphalitis. Pediatr Infect Dis J. 2004 Jan; 23 (1):22-6.
18- McKenna H, Johnson D. Bacteria in neonatal omphalitis. Pathology. 1997 Apr; 9 (2):111-3.
19- Jawetz. Melnick Adelberg's medical microbiology, 23th ed. Tehran: Tayyeb, 2009:130-148.
20- Amirian S, Amini K, Parviz M. Identification of *Mycoplasma Pneumonia* isolated from the respiratory secretions of patients with chronic obstructive pulmonary disease using polymerase chain reaction in Kerman Province, Iran. Tabari J Preventive Med. 2015 Winter; 3 (1):8-15. [Full text in Persian]
21- Ayatallahi J, Mellat A, Ayatallahi J, Hashemi A, Taghi poor Zahor SH, Ghasemi N. PCR application in infectious disease diagnosis. J shaheed sadoughi univ Med Sci. 2011 Jan-Feb;18 (6):578-586. [Full text in Persian]
22- Ahmadi shoar SH, nahayee M, Mozafari N. Study the susceptibility of isolated strains of Staphylococcus aureus from clinical specimens against Vancomycin using E-test in Tabriz. J Tabriz Univ Med Sci. 2010 Jul; (2):17-23. [Full text in Persian]
23- Abaszadeh F, Hajizadeh Z, Kafaee atriyan M, Bagheri A, Sarafraz N. Comparison of the effect of topical breast milk administration and the method of dry-keeping on the colonization of umbilical cord microorganisms in newborn infants. J Kermanshah Univ Med Sci. 2014 April; 18 (1):1-8. [Full text in Persian]
24- Bhandari V. Effective biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis. J Pediatric Infect Dis Soc. 2014 Aug; 3 (3):234-245.
25- Akiya A. Molecular analysis of vancomycin-resistant genes of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens [dissertation]. Saveh Univ. 2015.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.18.3.377]