«مقالهٔ اصیل»

ژنوتایپینگ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای ایزوله‌شده از بیماران سوختگی دو بخش زنان و مردان بیمارستان طالقانی اهواز با روش RAPD-PCR

فاطمه نانوازاده[۱]، آذردخت خسروی[۲]، محمدرضا ذوالفقاری[۳*]، نجمه پرهیزگاری[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۶۶۲۱۱۳۷۶
fnanvazadeh@yahoo.com

۲- استاد باکتری شناسی، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۶۶۱۶۵۳۵۸
azarkhosravi69@gmail.com

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۲۴۵۱۳۷۸۳
MReza.zolfaghary@gmail.com

۴-دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، اهواز، اهواز، ایران.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۲۷۹۵۳۳۲۵
parhizgarin@gmail.com

* نویسندهٔ مسؤول:
محمدرضا ذوالفقاری؛ ایران، قم، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۲۴۵۱۳۷۸۳
MReza.zolfaghary@gmail.com

چکیده

زمینه: سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل اصلی عفونت‌های فرصت-طلب، به‌ویژه در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی و در بخش‌هایی نظیر ICU و سوختگی می‌باشد، که در صورت عدم رعایت نکات بهداشتی لازم، به‌سرعت کلونیزه شده و انتشار می‌یابد. سویه‌های کلونیزه‌شده، ممکن است از منابع گوناگون بوده یا منبع مشترکی داشته باشند.

هدف از این مطالعه، ارزیابی ارتباط بین سویه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا در بیماران سوختگی با روش ژنوتایپینگ مولکولی RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) می‌باشد.

روش: از ۷۰ ایزولهٔ مشکوک به سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری‌شده، ۴۴ سویه با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تأیید شدند. تکنیک RAPD-PCR با استفاده از پرایمر کوتاه ۲۷۲، الگوهای الکتروفورزی تکرارپذیر به-وجود آورد و ارتباط ژنتیکی بین سویه‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: انگشت‌نگاری ژنتیکی با تکنیک RAPD-PCR، ۱۳ الگوی باندی با طول bp ۲۷۰۰-۱۸۰ نشان داد. هر ایزوله بین ۳ تا ۶ باند از این ۱۳ الگو را نشان داد که شامل ۹ ژنوتیپ مختلف (I-IX) می‌شد. بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ I و کمترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ‌های Vو VIII، به‌ترتیب با (۲۰٪) ایزولهٔ باکتری و (۵٪) ایزولهٔ باکتری بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد این روش ابزار ژنوتیپ‌بندی با قدرت افتراق بالا در مطالعات اپیدمیولوژی و پلی‌مورفیسم سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. با توجه به داده‌های این مطالعه، بر نیاز جدی به کنترل منابع عفونت در بخش‌های سوختگی، جهت کنترل و پیشگیری از انتقال این باکتری تأکید می‌شود.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، RAPD-PCR، ژنوتایپینگ مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۰ **تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۱۹**

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا شایع‌ترین پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی در خانوادهٔ سودوموناداسه می‌باشد (۱) که مقاومت ذاتی در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها را از خود نشان می‌دهد و این مسأله، درمان عفونت‌های ناشی از این پاتوژن را با مشکلات اساسی مواجه نموده است. بیماران دچار سوختگی به‌دلیل وجود زخم سوختگی، از دست رفتن سد دفاعی پوست و استرس ناشی از سوختگی، دچار ضعف سیستم ایمنی بوده و لذا حساسیت بالاتری نسبت به عفونت با میکرو ارگانیسم‌ها را دارند (۲–۸). گاهی کلونیزه شدن زخم سوختگی با سودوموناس از یک‌سو و فقدان پاسخ نوتروفیلیک مناسب به تهاجم بافتی، بیمار را به فاز باکتریمی و سپتی سمی می‌برد که سریعاً منجر به مرگ بیمار می‌شود (۹، ۱۰)؛ به‌طوری‌که از نظر اتیولوژی در ۲۵ سال گذشته، سودوموناس آئروژینوزا عامل حدود ۷۷ درصد مرگ و میر در بیماران دچار سوختگی بوده است (۱۱، ۱۲).

ژنوتایپینگ سودوموناس آئروژینوزا با روش‌های مولکولی PCR-based، که نسبت به روش‌های فنوتیپی کمتر تحت تأثیر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرند، نقش بسیار مهمی در ردیابی مسیرهای انتقال این پاتوژن دارند. بر اساس مطالعات انجام‌شده روش‌های مولکولی، قدرت تشخیص و تکرارپذیری بالاتری نسبت به تست‌های فنوتیپی دارند و این پیشرفت، به‌دلیل توانایی آنها در تعیین تفاوت‌های ژنومی کوچک و ثبات مولکولی بالا، در مقایسه با پروفایل‌های فنوتیپی همان گونهٔ باکتری است (۱۳، ۱۴).

روش‌های تیپ‌بندی قدیمی مبتنی بر PCR نظیر Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)، شاخص‌هایی از تغییرات ژنومی را نشان می‌دهند که در مقیاس آزمایشگاهی، مقایسهٔ آنها با هم مشکل می‌باشد. از طرفی، روش‌های تایپینگ مولکولی پیشرفته‌تر نظیر Multilocus Sequence Typing (MLST)(۱۵) و Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) – PCR (۱۶) روش‌هایی کارآمد، کامل و دقیق برای شناسایی ژنوتیپ‌های باکتری می‌باشند.

تکنیک RAPD-PCR یکی از سریع‌ترین روش‌های تایپینگ بوده که به آسانی قابل انجام است و در سال‌های اخیر به‌دلیل سادگی، حساسیت، تکرارپذیری، هزینهٔ نسبتاً پایین، سرعت بالا و قدرت افتراق بین سویه‌ای، توجه زیادی به آن شده است (۱۳، ۱۷). مطالعات انجام‌شده در بیماران سوختگی نشان‌دهندهٔ قدرت بالاتر روش RAPD در تیپ‌بندی مولکولی نسبت به روش RFLP می‌باشد که پیشنهاد می‌کند که می‌توان از تکنیک RAPD که قدرت بالایی در افتراق بین سویه‌ها دارد به‌جای تکنیک PFGE استفاده نمود (۱۸– ۲۱).

واکنش‌های RAPD همان واکنش‌های PCR معمولی هستند؛ با این تفاوت که در این تکنیک، یک تک پرایمر کوتاه (۸mers–۱۲) می‌تواند به‌صورت تصادفی، به چندین قطعه از DNA باکتری متصل شده و الگوهای الکتروفورزی تکرارپذیر برای تعیین افتراق ژنوتیپی به‌وجود آورد.

چنانچه در جایگاهی از DNA الگو که قبلاً پرایمر به آن متصل می‌شده است موتاسیون رخ داده باشد، محصول PCR مربوط به این جایگاه تولید نشده و در نتیجه الگوی مختلفی از قطعات DNA تکثیرشده بر روی ژل الکتروفورز مشاهده خواهد شد. از دیگر تفاوت‌های این روش با PCR معمولی، استفاده از ۲ دمای Annealing متفاوت می‌باشد (۱۹، ۲۲).

با توجه به اینکه سودوموناس آئروژینوزا، از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی خصوصاً در بیماران سوختگی می‌باشد، بنابراین آگاهی از چگونگی انتشار سویه‌های این باکتری، از اهمیت اپیدمیولوژیک ویژه‌ای به‌منظور یافتن منبع عفونت، ارزیابی چگونگی انتشار

Archive of SID
www.SID.ir

سویه‌ها و کنترل سریع شیوع پاتوژن به‌ویژه سویه‌های مقاوم چند دارویی، برخوردار است (۲۳) و از آنجا که به‌نظر می‌رسد ژنوتایپ‌های خاصی از باکتری در عفونت‌های مختلف وارد می‌شوند، هدف از این مطالعه، تعیین ژنوتایپ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جداشده از بیماران سوختگی، با تکنیک RAPD-PCR، جهت تعیین تنوع ژنتیکی آنها، بوده است.

روش

نمونه‌های بالینی: بیمارستان سوانح و سوختگی طالقانی اهواز، ۱۶۰ تخت خوابه و وابسته به دانشگاه جندی‌شاپور اهواز می‌باشد که در جنوب غرب ایران به حدود ۶ میلیون نفر خدمت‌رسانی می‌کند. این بیمارستان، تنها مرکز ارجاع در استان خوزستان و سه استان مجاور است. سالانه حدود ۱۲۰۰ بیمار سوختگی با درجات مختلف، در این بیمارستان بستری می‌شوند (۲۴). به‌دلیل اینکه دو بخش مردان و زنان این بیمارستان، بیشترین جمعیت بستری‌شده را داشتند مورد انتخاب قرار گرفتند. در این بیمارستان بخش مردان، اطفال و ICU در یک طبقه و بخش زنان در طبقه‌ای دیگر قرار دارد، لذا چون این دو بخش مورد مطالعه، در طبقات جداگانهٔ بیمارستان هستند، یکی از اهداف ما تعیین تعداد سویه‌های با الگوی ژنتیکی مشترک بین این دو بخش کاملاً مجزا بود.

بازهٔ زمانی بین دی ماه ۸۹ تا مهرماه ۹۰، برای نمونه‌گیری از بیماران سوختگی بستری در دو بخش مردان و زنان بیمارستان طالقانی اهواز انتخاب شد و تمامی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده طی این مدت، مورد بررسی ژنوتیپی قرار گرفت.

از ۷۰ نمونهٔ بالینی شامل ترشحات زخم، خون و ادرار جداشده از بیماران، با استفاده از محیط‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی استاندارد شامل SIM، MR-VP، Oxidation Fermentation (OF) و تولید پیگمان روی محیط مولر هینتون آگار (Himedia,India) ، ۴۴ نمونه سودوموناس آئروژینوزا به تأیید نهایی رسیدند (۲۵).

این نمونه‌ها برای انجام مراحل بعدی، در محیط Tripticase Soy Broth (TSB) (Himedia,India) گلیسرول دار ۱۵٪، در فریزر ۷۰°C- نگهداری شد.

استخراج DNA ژنومی: DNA ژنومی باکتری‌ها، از ۲۰۰µl سوسپانسیون سلولی (10^4-10^8) تهیه‌شده از کلنی‌های باکتریایی تک، با استفاده از کیت استخراج DNA (Bioneer, South Korea) استخراج شد.

RAPD-PCR بر اساس مطالعات قبلی، انجام شد (۲۳، ۲۶).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, USA)، با ۲۵ µl مخلوط اصلی حاوی ۱µl از DNA الگو، ۲/۵µl بافر PCR ۱۰X، ۱µl پرایمر الیگونوکلئوتید ۲۷۲ -3') (3'- AGCGGGCCAA- 5')(۲۳)، ۰/۵µl آنزیم *Taq* DNA polymerase، ۱/۵ µl dNTP mix، ۱µl $MgCl_2$ (All from Cinnagen,Tehran,Iran) و ۱۷/۵ µl distilled water انجام شد.

شرایط و برنامهٔ چرخه‌ها به شرح زیر بود: واسرشتگی (Denaturation) اولیه در ۹۶°C به‌مدت ۲ دقیقه، سپس ۳ چرخه با برنامهٔ واسرشتگی در ۹۴°C به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) پرایمرها به DNA الگو در ۳۶°C به‌مدت ۲ دقیقه و طویل‌سازی (Extension) در ۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه، ۲۹ چرخهٔ دیگر با برنامهٔ واسرشتگی در ۹۴°C به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در ۵۸°C به‌مدت ۱ دقیقه و طویل‌سازی در ۷۲°C به‌مدت ۱ دقیقه، انجام شد. مرحلهٔ طویل‌سازی نهایی در ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه بود.

محصولات RAPD-PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ (w/vol)(Cinnagen) رنگ‌آمیزی‌شده با ۰/۵ mg/ml از اتیدیوم بروماید (Cinnagen، انتقال داده شد و بعد

Archive of SID
www.SID.ir

از ژل الکتروفورز، در سیستم Gel-Documentation (Uvitec, UK) عکس‌برداری از ژل انجام شد. 100bp DNA ladder (Vinantis, Singapur) به‌عنوان استاندارد اندازهٔ مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. هر واکنش، حداقل ۳ بار برای ارزیابی تکرارپذیری، تکرار شد.

با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶، نتایج به‌صورت آماره‌های توصیفی ارائه گردید.

نتایج

نمونه‌های بالینی: نمونه‌های تأییدشدهٔ سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری‌شده به ۲۶ مرد و ۱۸ زن تعلق داشت. بیشتر بیماران بررسی‌شده در گروه سنی بین ۱۵–۲۰ سال بودند و بیشترین نمونهٔ بالینی بررسی‌شده مربوط به زخم سوختگی بود (۷۷٪). ۵۹٪ از نمونه‌ها از بخش مردان و بقیه (۴۱٪) از بیماران بخش زنان جداسازی شده بود.

با انگشت‌نگاری ژنوم باکتری‌ها با روش RAPD-PCR، ۱۳ الگو حاصل شد که باندهای حاصل از آن طیفی بین ۱۸۰ تا ۲۷۰۰ جفت باز را شامل می‌شد (جدول و شکل ۱).

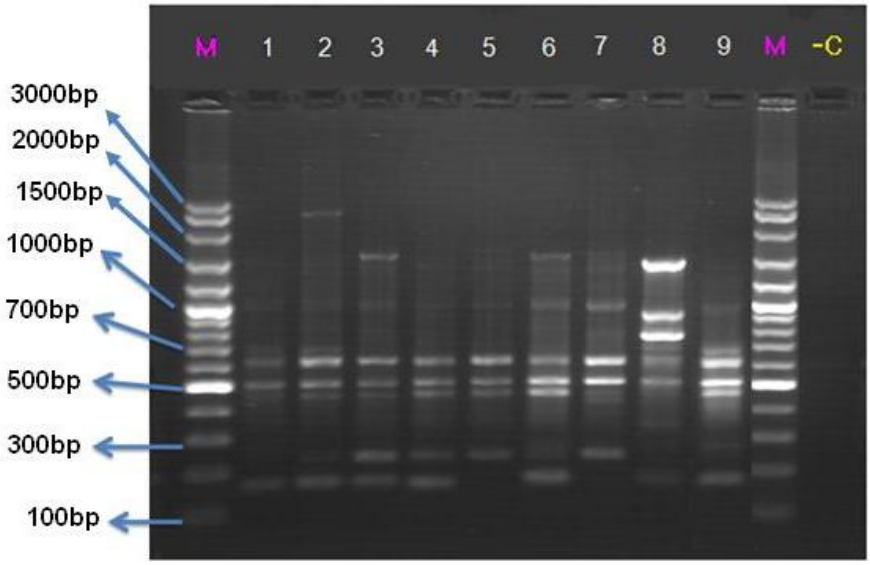
بیشتر نمونه‌های بررسی‌شده دارای ژنوتیپ I (۲۰٪) و ژنوتیپ‌های V و VIII کمترین فراوانی را داشت؛ به‌طوری‌که تنها در ۲ ایزوله دیده شدند (۵٪) (جدول ۲).

پراکندگی هر یک از ژنوتیپ‌ها بر اساس جنس بیماران به این صورت مشاهده شد که ژنوتیپ‌های I، II بیشتر در بخش زنان، ژنوتیپ VI بیشتر در بخش مردان و ژنوتیپ III انتشار برابری بین هر دو جنس داشت. روی‌هم‌رفته تنوع ژنوتیپی بیشتری در نمونه‌های حاصل از بخش مردان (۳۱٪) نسبت به بخش زنان(۲۸٪) دیده شد. ژنوتیپ‌های V ، VII، VIII و IX مختص بخش مردان و ژنوتیپ IV مختص بخش زنان بود.

جدول شماره ۳، ژنوتیپ‌های شناسایی‌شده را در ارتباط با نوع نمونهٔ بالینی و بخش‌های بیمارستان نشان می‌دهد. مطابق با این جدول، ژنوتیپ‌های I، II، III و VI در هر دو بخش‌های بیمارستان پراکندگی داشتند و بیشترین تنوع در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای ایزوله‌شده از نمونهٔ بالینی زخم مشاهده شد (ژنوتیپ‌های I تا IX).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: ژل حاوی نمونه‌های RAPD-PCR شده

(M: DNA molecular weight marker (100bp) -C: Negative Control 1-9: Samples)

جدول ۱: تعداد و طول باند الکتروفورزی، در هر یک از ژنوتیپ‌های سودوموناس آئروژینوزا

Bands(bp)	Genotype								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
۱۸۰	—	—	—	—					
۲۰۰						—			—
۲۵۰			—	—	—		—		
۴۷۰		—	—	—	—	—			—
۵۰۰	—	—	—	—	—	—	—	—	—
۶۰۰	—	—	—	—	—	—	—	—	—
۷۰۰		—							—
۸۰۰								—	
۹۰۰								—	
۱۰۰۰						—	—		
۱۵۰۰								—	
۱۶۰۰			—			—			
۲۷۰۰		—							
No.of bands	۳	۶	۶	۵	۴	۶	۴	۵	۵

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: توزیع ژنوتیپ‌های به‌دست‌آمده از ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوا

ژنوتیپ	تعداد ایزوله	درصد
I	۹	۲۰
II	۷	۱۶
III	۴	۹
IV	۴	۹
V	۲	۵
VI	۷	۱۶
VII	۴	۹
VIII	۲	۵
IX	۵	۱۱
۹	۴۴	۱۰۰ Total

جدول ۳: توزیع ژنوتیپ‌های سودوموناس آئروژینوزا در ارتباط با نوع نمونهٔ بالینی و بخش‌های بیمارستانی

Sample	Ward	Genotype								
Wound	مردان	۵	۲	۴	۱	۲		۲	۳	۳
	زنان				۳		۱	۳	۳	۲
Urine	مردان									
	زنان						۱			۳
Blood	مردان				۳					۱
	زنان					۱		۱		
		۵	۲	۴	۷	۲	۴	۴	۷	۹ Total

بحث

در مطالعات اپیدمیولوژیک، توجه به چگونگی انتشار و پراکندگی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در هر بیمارستان حایز اهمیت می‌باشد. نشان داده شده است که در بین سیستم‌های ژنتیکی، روش‌های ژنوتیپ‌بندی مولکولی سریعی مانند RAPD-PCR، اختصاصیت و حساسیت بالایی برای شناسایی و تفکیک ایزوله‌های باکتریایی دارد (۲۷،۱۴).

در این مطالعه، از میان ۴۴ ایزوله، ۱۳ الگوی باندی مختلف مورد شناسایی قرارگرفت. استفاده از پرایمرهای کوتاه در این تکنیک منجر به تکثیر چندین قطعه از ژنوم باکتری می‌شود. در این مطالعه، از پرایمر ۲۷۲ استفاده شد. این پرایمر الگوهای ژنوتیپی بیشتری را نشان می‌دهد و پروفایل‌های حاصل از آن تکرارپذیری و قدرت تفکیک بالاتری دارد (۲۸).

افتخار و همکاران در سال ۲۰۰۹ در تهران، با استفاده از این پرایمر باندهای زیادی به‌دست آوردند و نشان دادند که قدرت تفکیک بهتری را نسبت به پرایمر ۲۸۰ داشته است (۲۰).

Archive of SID
www.SID.ir

در مطالعهٔ ما، پلی‌مورفیسم بالایی (۲۰٪) در بین ژنوتیپ ها مشاهده شد. این مطلب، مشابه نتیجهٔ حاصل از مطالعهٔ آکانجی (Akanji) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در نیجریه بود (۴). گزارشات متفاوتی در مورد درصد پلی‌مورفیسم در سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد. در مطالعهٔ نازیک (Nazik) و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه که بر روی سودوموناس آئروژینوزای ایزوله‌شده از بیماران سیستیک فیبروزیس انجام شد، پلی‌مورفیسم بیشتری (۴۳٪) گزارش شد (۲۳). دلیل پلی‌مورفیسم در آن مطالعه نسبت به مطالعهٔ حاضر می‌تواند ناشی از این نکته باشد که در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس سیستم ایمنی به شدت ضعیف بوده و سویه‌ای با ویرولانس متفاوتی قادر به ایجاد عفونت در این بیماران بوده است و احتمال جداسازی سودوموناس آئروژینوزا با ژنوتیپ‌های متنوع‌تر دور از انتظار نیست.

همچنین در مطالعهٔ سلیمی (Salimi) و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تهران، ۸ ژنوتیپ متفاوت با پلی‌مورفیسم ۶٪ را در سودوموناس آئروژینوزاهای مربوط به بیماران سوختگی شناسایی کردند (۱۸). هر چند که تعداد ژنوتیپ‌های شناسایی‌شده در این مطالعه، به مطالعهٔ ما نزدیک بود، ولی تنوع کمتری در این نمونه دیده شد که این مطلب می‌تواند به‌دلیل وجود برنامه‌های دقیق کنترل کیفی در بیمارستان سوختگی بررسی‌شده در آن پژوهش باشد. همچنین یکی از دلایل تنوع بین نمونه‌های بالینی این مطالعه می‌تواند در نتیجهٔ بزرگ بودن اندازهٔ ژنوم این باکتری باشد که احتمال موتاسیون و ایجاد پلی‌مورفیسم را افزایش می‌دهد (۱۹).

نتایج این مطالعه نشان داد که بیشتر ژنوتیپ‌های مشاهده‌شده بین هر دو بخش بیمارستان مشترک بود که نشان‌دهندهٔ قابلیت بالای انتقال ژنوتیپ‌های I، II، III و VI است که در هر دو بخش دیده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که منشأ این ایزوله‌ها مشابه بوده است. احتمال انتقال آنها به‌واسطهٔ پرستاران یا ابزارهای پزشکی، امکان‌پذیر است و ژنوتیپ‌های V، VII، VIII، IX و ژنوتیپ IV، قابلیت انتقال پایین‌تری داشته‌اند و به‌ترتیب تنها در بخش مردان و بخش زنان دیده شدند.

به‌علاوه ژنوتیپ I نه تنها ژنوتیپی بود که در هر دو بخش، بیشترین فراوانی را داشت؛ بلکه در بین همهٔ نمونه‌های بالینی نیز بیشترین فراوانی را داشت. این نکته اهمیت زیادی دارد، زیرا انتظار می‌رود که اشتراک ژنوتیپی بین نمونه های بالینی مختلف کمتر باشد، ولی در بیمارستان مورد بررسی، ارتباط تنگاتنگ و اشتراک بالایی بین نمونه‌های مختلف دیده شد.

بیشترین تنوع در نمونهٔ بالینی به‌دست‌آمده از ترشحات زخم سوختگی بیماران وجود داشت (۹ ژنوتیپ) و پس از آن در نمونه‌های خون که ۴ ژنوتیپ مختلف دیده شد. البته در مورد تنوع بالای دیده‌شده در این نمونه‌ها نتیجه‌گیری کمی مشکل است که آیا در خون بیماران هم امکان مشاهده تنوع بیشتری وجود دارد یا خیر.

تعدادی از ژنوتیپ‌ها به‌صورت منحصر به فرد تنها در یکی از بخش‌ها دیده شد؛ به عنوان مثال، ژنوتیپ IV تنها از بخش زنان و ژنوتیپ V و IX نیز تنها از بخش مردان ایزوله شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که ارتباط معناداری بین تنوع ژنتیکی ایزوله‌ها و سن بیماران وجود نداشت.

این مطالعه نشان داد که پلی‌مورفیسم بالایی در میان ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مربوط به یک بیمارستان وجود دارد. این نخستین گزارش از تنوع ژنتیکی مربوط به بیماران سوختگی در محل مورد مطالعه بوده است. به نظر محققان این پژوهش، شناسایی ژنوتیپ‌ها و طبقه‌بندی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای ایزوله‌شده از بیماران سوختگی، اهمیت زیادی در پیگیری نوع سویه‌های کلونیزه‌شده در بیماران از نظر شدت ویرولانس و مقاومت دارویی داشته است و راهنمای مفیدی جهت انجام اقدامات پیشگیرانه و درمانی را در اختیار پزشکان قرار می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که بدین-وسیله از همکاری مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز و همچنین از پرسنل محترم بیمارستان سوانح و سوختگی طالقانی اهواز تشکر نمایند.

References

1-Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. J Infect 2009;59(Suppl1):S4-16.
2-Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectiouse diseases, 7th ed. Philadelphia : Churchill Livingstone/Elsevier, 2010. P. 2835-57.
3-Floret N, Bertrand X, Thouverez M, Talon D. [Nosocomial infections caused by Pseudomonas aeruginosa: Exogenous or endogenous origin of this bacterium]. Pathol Biol (Paris) 2009; 57(1):9-12. [In French]
4-Akanji BO, Ajele JO, Onasanya A, Oyelakin O. Genetic fingerprinting of Pseudomonas aeruginosa involved in Nosocomial Infection as Revealed by RAPD-PCR Markers. Biotechnology 2011;10(1):70-7.
5-Ortiz-Herrera M, Gerónimo-Gallegos A, Cuevas-Schacht F, Pérez-Fernández L, Coria-Jiménez R. [RAPD-PCR characterization of Pseudomonas aeruginosa strains obtained from cystic fibrosis patients]. Salud Publica Mex 2004;46(2):149-57. [In Spanish]
6-Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs 2007;67(3):351-68.
7-Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev 2006;19(2):403–34.
8-Bloemsma GC, Dokter J, Boxma H, Oen IM. Mortality and causes of death in a burn centre. Burns 2008;34(8):1103-7.
9-Kolak J, Van Saene HK, de la Cal MA, Silvestre L, Peric M. Control of bacterial pneumonia during mechanical ventilation. Croat J Med 2005;46(2):183-96.
10-Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect 2005; 11 Suppl 4:17-32.
11-Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in the South of Iran. Burns 2006;32(3): 343–7.
12-Tredget EE, Shankowsky HA, Rennie R, Burrell RE, Logsetty S. Pseudomonas infections in the thermally injured patient. Burns 2004;30(1):3-26.
13-Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006;19(3):512-30.
14-Thangaraj M, Prem V, Ramesh T, Lipton AP. RAPD fingerprinting and demonstration of genetic variation in three pathogens isolated from Mangrove environment. Asian J Biotechnol 2011;3(3):269-74.
15-Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, et al. Population structure of Pseudomonas aeruginosa. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(19):8101-6.
16- Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol 2006;60:561-88.
17-Tang YW, Stratton CW. Advanced techniques in diagnostic microbiology. New York: Springer; 2006. P. 91-246.
18-Salimi H, Owlia P, Yakhchali B, Rastegar Lari A. Characterization of Pseudomonas aeruginosa in burn patients using PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. IJMS 2010; 35(3):236-41.
19-Tazumi A, Maeda Y, Buckley T, Millar B, Goldsmith C, Dooley J, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from horses in Ireland. Ir Vet J 2009;62(7):456-9.
20-Eftekhar F, Hosseinkhan N, Asgharzadeh A, Tabatabaii A. Genetic profiling of Pseudomonas aeruginosa isolates from Iranian patients with cystic fibrosis using RAPD-PCR and PFGE. Iran J Basic Med Sci 2009;12(3-4):126-32.
21-Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhie JH. Application of different genotyping methods for Pseudomonas aeruginosa in a setting of endemicity in an intensive care unit. J Clin Microbiol 1999;37(11):3654-61.
22-Abou-Dobara MI, Deyab MA, Elsawy EM, Mohamed HH. Antibiotic susceptibility and genotype patterns of Escherchia coli, Klebsiella pneuomoniae and Pseudomonas aeruginosa isolated from urinary tract infected patients. Pol J Microbiol 2010;59(3):207-12.

Archive of SID
www.SID.ir

23-Nazik H, Ongen B, Erturan Z, Salcioglu M. Genotype and antibiotic susceptibility patterns of Pseudomonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia isolated from cystic fibrosis patients. Jpn J Infect Dis 2007;60(2-3):82-6.
24-Ekrami A, Samarbafzadeh A, Alavi M, Kalantar E, Hamzeloi F. Prevalence of methicillin resistant Staphylococcus species isolated from burn patients in a burn center, Ahvaz, Iran. Jundishapur J Microbiol 2010;3(2):84-91.
25-Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis: Mosby; 2007. P. 389-97.
26-Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996;34(5):1129-35.
27-Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990;18(22):6531-5.
28-da Silva Filho LV, Levi JE , Bento CN, Rodrigues JC, da Silvo Ramos SR. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. J Med Microbiol 2001;50(3):261-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from two wards of Taleghani Hospital by RAPD-PCR in Ahvaz City of Iran

Fatemeh Nanvazadeh[1], Azar Dokht Khosravi [2], Mohammad Reza Zolfaghary[3*], Najmeh Parhizgari[4]

1-Msc Student of Microbiology, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

2-Professor of Bacteriology, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3-Asistante Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

4-Msc Student of Medical Microbiology, Department of Medical Microbiology, School of Medicine,Student Reserch Committee,Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

[*]Corresponding Author: Mohammad Reza Zolfaghary, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
Tel:09124513783
Email:MRezaZolfaghary@gmail.com

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is a major health hazard particularly in immunodeficient patients, patients in ICU and burn units. It may be originated from different sources, and comprises a high colonization and transmission capacity. The present study aimed to investigate the genotypic variation of *Pseudomonas aeroginosa* strains isolated from burn patients using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method.

Methods: Within 70 clinical samples collected from burn patients in Taleghani Burn Hospital , 44 samples were positive for *P. aeruginosa* by application of conventional tests. The RAPD-PCR method was applied according to standard method using a short single primer. The technique created repetitive electrophoresis patterns, which was used for genotypic differentiation.

Results: Genetic fingerprinting of RAPD-PCR, created 13 different genotypic patterns with base pair length ranging from 180 to 2700. Each isolate roughly showed between three to six genotypic patterns. The patterns comprised nine genotypic diversity, designated as I to IX with genotype I as the most common, identified in 20% bacterial isolates. The least prevalent genotypes were V and VIII, identified in only 5% isolates.

Conclusion: Based on the results, RAPD-PCR technique was found as an useful tool to investigate the genetic variation for *P.aeruginosa* strains. This technique is a rapid and low cost genotypic method with high discriminatory power. The results could assist the screening of original infection caused by *P.aeruginosa* straines with subsequent control of colonization and transmission.

Keywords: *P. aeruginosa*, RAPD-PCR, Molecular Genotyping

►*Please cite this paper as:*
Nanvazadeh F, Dokht Khosravi A, Zolfaghary MR, Parhizgari N. Genotyping of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from two wards of Taleghani Hospital by RAPD-PCR in Ahvaz city of Iran. Jentashapir Sci Med J 2013; 49-58

Received: 31.10.2012 **Accepted: 08.04.2013**

Archive of SID
www.SID.ir