دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۶، صفحه ۱۲۰۷ – ۱۱۹۸ (بهمن و اسفند ۱۳۹۴)
ISMJ 2016;18(6): 1198-1207

تایپینگ ملکولی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی در شیراز، ایران

عزیز ژاپونی [۱]، مجتبی انوری‌نژاد [۱*]، جلال مردانه [۲]

[۱] مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۴/۳۱- پذیرش مقاله: ۹۳/۷/۲۳)

Archive of SID

چکیده

مقدمه: پسودوموناس آئروژینوزا از عوامل اصلی ایجادکننده عفونت در بیماران سوختگی می‌باشد که زندگی بسیاری از این بیماران را تهدید می‌کند. هدف از مطالعه حاضر تشخیص و ردیابی منبع عفونت با استفاده از دو روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (AP-PCR) و الگوی پلاسمیدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: هفتاد و چهار سویه پسودوموناس از بیماران دچار سوختگی و محیط بیمارستان در بیمارستان قطب‌الدین شیراز جدا شدند. تیپ‌بندی ملکولی سویه‌ها توسط دو روش ذکر شده انجام گردید. سپس ایزوله‌ها توسط دندروگرام دسته‌بندی و درصد تشابه آن‌ها با استفاده از برنامه NTSYS و Photo Capt مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: بر اساس درصد تشابه ۵۰ درصد و ۶۴/۷ درصد و ۶۷/۵ درصد به‌دست آمده به‌وسیله دندروگرام، ۳۸ الگوی پلاسمیدی تشخیص داده شد که به ترتیب در خوشه‌های۲، ۳ و ۵ طبقه‌بندی گردیدند. دندروگرام محصولات AP-PCR به ۴۷ تیپ مختلف تقسیم‌بندی شد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که در طول بستری بیماران سوختگی، تیپ‌های خاصی از پسودوموناس آئروژینوزا در محیط بخش سوختگی بیمارستان شایع هستند و بیماران را درگیر می‌کنند. برای کنترل آلودگی زخم‌های بیمار با گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، بایستی محیط حمام را پس از شستشوی محل سوختگی بیماران با مواد ضدعفونی کننده قوی گندزدایی کرد.

واژگان کلیدی: پسودوموناس آئروژینوزا، الگوی پلاسمید، منبع عفونت، AP-PCR

شیراز، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
Email :anvarinejad@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی از جدی‌ترین عوارض در بیماران سوختگی بستری در بیمارستان هستند. عفونت‌های ناشی از باکتری پسودوموناس آئروژینوزا به ویژه سویه‌های مقاوم به چنددارو به عنوان یک مشکل اساسی باعث ایجاد عوارض و مرگ ومیر در این بیماران می‌شود (۱ و ۲).

بیماران سوختگی که با پسودوموناس کلونیزه شده‌اند را می‌توان به‌عنوان مخزن مهم عفونت معرفی کرد و تداوم ارگانیسم در محیط بیمارستان‌ها باعث انتقال فرد به فرد و رشد و بقا آن در بیمارستان می‌گردد (۳). سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا بر اساس خصوصیات فنوتیپی شناخته شده‌اند، اما همه‌گیرشناسی بیمارستانی در طول دهه اخیر به علت ایجاد روش‌های جدید تیپ‌بندی متحول شده است. قدرت تفکیک بالای روش‌های ژنوتیپی در جداسازی پسودوموناس آئروژینوزا، به خصوص، ریبوتایپینگ، تجزیه و آنالیز به‌وسیله آنزیم‌های محدود کننده و روش پالس فیلد ژل الکتروفورز (۸-۴) موجب استفاده بیشتر از این روش‌ها شده است. با این حال استفاده از این روش‌ها در آزمایشگاه بالینی به دلیل هزینه بالا و پیچیدگی‌های فنی محدود می‌باشد (۹).

تکنیک‌های جایگزین و ساده بر اساس پروفایل پلاسمید و PCR با پرایمر کوتاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (AP-PCR) به صورت موفقیت‌آمیزی در جداسازی میکروارگانیسم‌های مهم پزشکی مثل پسودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰ و ۱۱). گاد (Gad) و همکاران به مطالعات فنوتیپی و ژنوتایپی بر روی ایزوله‌های محیطی و بالینی پرداخته‌اند و در نتایج آن‌ها سویه‌های محیطی مقاومت بالاتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نشان داده‌اند (۱۰). مطالعات انجام شده در ایران بر روی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده از بیماران سوختگی نشان داده که این سویه‌ها به بسیاری از کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی مقاوم هستند، دارای الگوی فنوتیپی مشابهی بوده و پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آن‌ها بسیار مشابه است (۱).

برای پی بردن به این موضوع که آیا این ایزوله‌ها سویه‌های ساکن بیمارستان بوده که بیماران را کلونیزه و بین بیماران، پرسنل و محیط بیمارستان در چرخش هستند نیاز به مطالعات ملکولار اپیدمیولوژیک می‌باشد.

هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه پروفایل ژنتیکی ایزوله‌های مختلف باکتری پسودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش‌های ملکولی در بیمارستان سوختگی قطب‌الدین شیراز به منظور یافتن رابطه ژنتیکی بین سویه‌های بالینی و و سویه‌های جداشونده از محیط بیمارستان بود. مشخص شدن این موضوع به ما نشان می‌دهد که آیا سویه‌های ایجادکننده عفونت در بیماران از محیط بیمارستان منشاء می‌گیرند و در واقع سویه‌هایی بیمارستانی هستند که از یک کلون میکروبی بوده و بین بخش‌های مختلف بیمارستان منتقل می‌گردند. در این طرح نتایج پروفایل پلاسمید و AP-PCR را به منظور مشخص کردن الگوی ژنتیکی ایزوله‌های بالینی جدا شده از بیماران سوختگی و محیط بیمارستانی در مرکز سوختگی در شیراز مورد بررسی قرار دادیم در این مطالعه تنوع ژنتیکی در میان این باکتری‌ها به منظور شناسایی پلی‌مورفیسم‌های DNA و ارتباط آن با عفونت پسودوموناس در مرکز سوختگی مورد بررسی قرار گرفت. به‌علاوه قدرت افتراق هر دو روش تایپ‌بندی برای مطالعات اپیدمیولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۶۳ سویه پسودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بیمارستان سوختگی قطب‌الدین شیراز و ۱۱ سویه از محیط این بیمارستان جدا شدند. نمونه‌گیری از افراد پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آن‌ها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه صورت پذیرفت. نمونه‌گیری با استفاده از سواب استریل از زخم‌های تمام بیماران با درجات مختلف سوختگی بستری شده در بیمارستان و نیز محیط بیمارستان شامل سطوح مختلف، حمام، کف، سینک دستشویی، تخت بیمار انجام شد. در آزمایشگاه میکروب‌شناسی سواب‌های جمع‌آوری شده بر روی محیط‌های بلاد آگار، شکلات آگار و مک‌کانکی آگار (ساخت شرکت Oxoid) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند سپس از کلونی‌های مشکوک مجدداً ساب کالچر انجام و کلونی خالص از ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا به‌دست آورده شد. تشخیص نهایی ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های میکروبیولوژی شامل خصوصیات مورفولوژیک و نیز تست‌های بیوشیمیایی شامل اکسیداز، کاتالاز، توانایی تولید پیگمان پیوسیانین، بو، سیترات، محیط آگار آهن سه قندی مورد تأیید نهایی قرار گرفتند. ایزوله‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) براث (ساخت شرکت Oxoid) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱).

استخراج مجموع ژنوم و پلاسمید

برای آماده کردن DNA پلاسمید، یک کلونی از هر سویه به ۱۰۰ میلی‌لیتر فلاسک حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB کشت داده شد. فلاسک به مدت یک شب در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سلول‌ها توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند. در مرحله بعد سلول‌های ته‌نشین‌شده در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر شستشو داده شدند. DNA پلاسمیدی بر اساس روش لیز قلیایی که Birnboitm و Doly بکار برده بودند، استخراج شدند (۱۲). سپس با حرارت دادن ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و با پروتئیناز K هضم، و به‌وسیله فنل کلروفرم استخراج گردیدند. DNA ژنومی نمونه‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه در مجاورت اتانول خالص، تهیه گردیدند.

تجزیه و تحلیل الگوهای پلاسمیدی

استخراج DNA پلاسمید توسط الکتروفورز افقی در ۰/۸ درصد آگاروز از هم جدا و در بافر Tris- EDTA- استات در دمای اتاق و جریان ۶۰ ولت به مدت ۴ ساعت جدا گردید. پس از الکتروفورز ژل را به مدت ۱ ساعت درون ظرف رنگ‌آمیزی حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و سپس شستشوی آن به مدت ۲۰ دقیقه به‌وسیله آب مقطر انجام گردید. ژل را برای بررسی و عکس‌برداری در دستگاه gel scan (United States Of America، Kodak، Gel Logic 200) قرار داده و از آن عکس گرفته شد. وزن ملکولی پلاسمیدهای جدا شده بر اساس حرکت آن‌ها بر روی ژل و در برابر مارکر (Supercoiled DNA Ladder) تعیین گردید.

تیپ‌بندی الگوهای پلاسمیدی

با استفاده از برنامه Photo Capt وزن ملکولی پلاسمیدها تعیین گردید. ضریب افتراقی (DI) به‌وسیله ایندکس سیمپسون (SID) مشخص شد (۱۳). تعیین شباهت در بین ایزوله‌ها با کمک نرم‌افزار NTSYS ویرایش K ۲/۰۲ و ترسیم دندروگرام انجام گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

شرایط تعیین AP-PCR

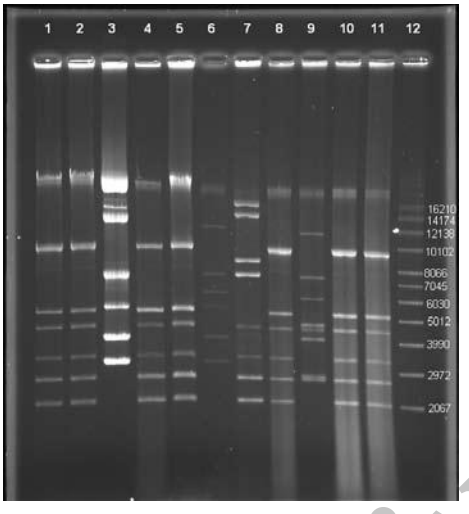
در یک حجم ۵۰ میکرولیتری مواد زیر اضافه گردید: ۰/۵ میلی مولار پرایمر (GGT -AGG<۵ CTT<۳) (TIB مول BIOL Syntheselabor، GmbH برلین، آلمان)، ۲۰۰ میکرو مولار dNTPs، ۲/۵ میلی‌مولار MgCl2، ۲/۵ واحد پلیمراز Taq (سینا ژن، ایران) و ۵ میکرولیتر DNA. تکثیر DNA برای ۴۵ دوره به شرح زیر انجام شد: دناتوراسیون DNA در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال DNA به پرایمر در ۳۷ درجه به مدت ۳ دقیقه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. بعد از ذخیره عکس‌ها به کمک برنامه کامپیوتری به نام Photo Capt تعداد و اندازه باندهای جداشده هر ایزوله در مقایسه با مارکر مخصوص ۱۰۰bp (Lithuania، MBI Fermentas) تعیین گردید. برای ترسیم دندروگرام و ارتباط میان داده با استفاده از روش Average Linkage، داده‌های تنظیم شده در برنامه Unweighted pair-group method analysis (UPGMA) مورد آنالیز قرار گرفتند. سپس برای مطالعه الگوی تغییرات مشاهده شده در میان ایزوله‌ها نتایج قبلی در کنار یکدیگر بررسی شدند و در آخر نرم‌افزار کامپیوتری NTSYS-PC مورد استفاده قرار گرفت تا نتیجه نهایی به‌دست آمد.

تیپ‌بندی به روش AP-PCR

آنالیز و تجزیه و تحلیل محصولات این روش مشابه روش تیپ‌بندی پلاسمیدی انجام گردید و دندروگرام مربوطه رسم شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۳۸ الگوی مختلف پلاسمید از ۶-۹ باند جدا شده توسط برنامه کامپیوتری Photo Capt با شاخص افتراق قابل قبول (DI=۰/۹۳) به دست آمد. الگوی پلاسمید برای برخی از نمونه‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱) الگوی پلاسمیدی ۱۱ سویه از پسودوموناس آئروژینوزای. چاهک شماره ۱و ۲ دو سویه با الگوی یکسان، چاهک ۳ سویه با الگوی متفاوت، چاهک ۴ و ۵ دو سویه با الگوی یکسان، چاهک ۶،۷،۸ و ۹ چهار الگوی متفاوت، چاهک ۱۰ و ۱۱ دو الگوی یکسان، چاهک ۱۲ مارکر (Supercoiled DNA Ladder).

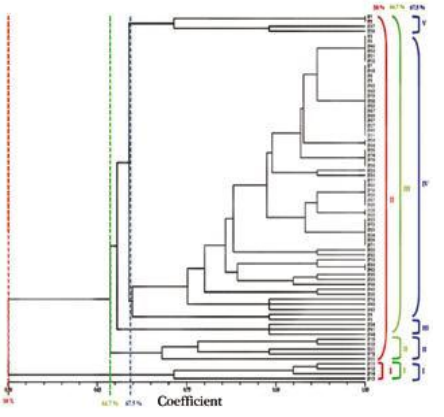
بر اساس تعداد و اندازه باندها دندروگرام رسم شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ۳ نقطه شامل ۵۰ درصد و ۶۴/۷ درصد و ۶۷/۵ درصد بر روی دندروگرام به عنوان سطوح تشابه کم، متوسط و بالا انتخاب شدند. هنگام استفاده از این معیارها نمونه‌های بیماران و ایزوله‌های محیطی به ترتیب به ۲ گروه (I&II) و ۳ گروه (I,II&III) و ۵ گروه (IV&V، III، II، I) خوشه‌بندی شدند (شکل ۲).

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط برنامه Photo Capt تجزیه و تحلیل شد که تعداد باندها بین ۳ تا ۱۲ باند، و وزن ملکولی بین bp ۳۷/ تا ۳/۷

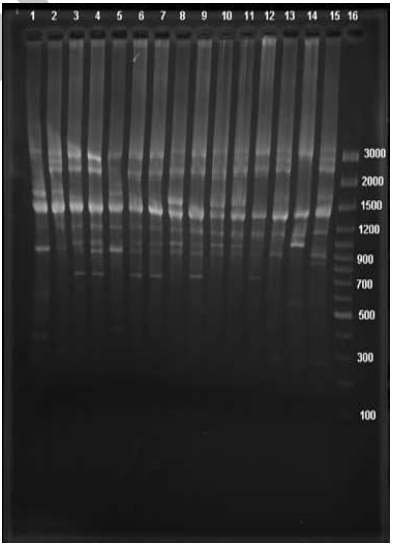
Archive of SID

www.SID.ir

متغیر بود و در مجموع ۴۷ الگوی متفاوت بدست آمد (شکل ۳).

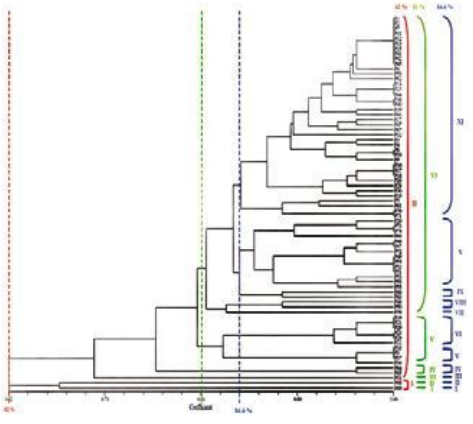


شکل ۲) دندروگرام الگوی پلاسمیدی ۷۲ سویه پسودوموناس. بر اساس درصد تشابه ۵۰ درصد، ۶۴/۷ درصد و ۶۷/۵ درصد به ترتیب ۲ ، ۳ و ۵ خوشه به‌دست آمد. شماره‌های لاتین نشان‌دهنده خوشه‌ها با شباهت‌های متفاوت است.



شکل ۳) الگوی به دست آمده از ۱۵ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا به کمک روشAP-PCR . چاهک شانزده مارکر ۱۰۰ جفت باز.

بر اساس الگوی دندروگرام ۳ سطح مختلف ۶۲ درصد، ۸۱ درصد و ۸۴/۶ درصد از درصد تشابه انتخاب شدند. با استفاده از این معیارهای به ترتیب به ۲ گروه (I&II) و ۵ گروه (IV&V، III، II، I) و ۱۱ گروه (X&XI، IX، VIII، VII، VI، V، IV، III، II، I) خوشه‌بندی شدند (شکل ۴).



شکل ۴) دندروگرام AP-PCR، ۷۴ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا. بر اساس درصد تشابه ۶۲ درصد، ۸۱ درصد و ۸۴/۶ به ترتیب ۲ ، ۵ و ۱۱ خوشه به‌دست آمد. شماره‌های لاتین نشان‌دهنده خوشه‌ها با شباهت‌های متفاوت است.

بحث

در این مطالعه نتایج آنالیز پروفایل ژنتیکی حاصل از آنالیز سویه‌های جداشده از نمونه‌های بالینی و محیط بیمارستان نشان می‌دهد که سویه‌های بالینی و سویه‌های جدا شده از محیط بیمارستان با هم همخوانی ژنتیکی داشته و احتمالاً از این Source می‌باشند. به طور کلی در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و نیز در طغیان عفونت‌های باکتریایی به منظور یافتن منشاء آلودگی و نیز راه‌های انتقال آن از تکنیک‌های مختلف تایپینگ (از جمله فنوتایپینگ و ژنوتایپینگ) استفاده می‌گردد. از آنجایی‌که خصوصیات فنوتیپی نظیر الگوهای بیوشیمیایی، تعیین تیپ فاز، آنتی‌ژن‌های سطحی سلول و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی تحت شرایط مختلف فاز رشد و جهش خود به خودی تمایل زیادی به تغییر دارند (۱۶-۱۴). بنابراین ضروری است در کنار روش‌های فنوتیپی از تکنیک‌های ژنوتیپی نیز استفاده کرد. امروزه روش‌های ژنوتیپی با قدرت افتراق بالا برای ارتباط بین سوش‌های داخل یک گونه و کلونالیتی و بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

اپیدمیولوژی سویه‌های یک گونه باکتریایی به‌کار می‌رود (۱۹-۱۷). در مطالعه حاضر تیپ‌بندی ۷۴ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا که از بیماران سوختگی و محیط بیمارستانی جدا شده بودند با استفاده از دو روش ملکولی انجام پذیرفت. به‌وسیله آنالیز پروفایل پلاسمیدی با DI=۰/۹۳ ایزوله‌های جداشده را به ۲، ۳ و ۵ گروه و به ترتیب با سطح تشابه ۵۰ درصد، ۶۴/۷ درصد و ۶۷/۵ درصد خوشه‌بندی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ایزوله‌های با DI بالاتر از ۰/۹۷ و سطح تشابه (۶۲ درصد، ۸۱ درصد و ۸۴ درصد) را به ۳ گروه ۲، ۵ و ۱۱ خوشه‌بندی کرد. پیشنهاد شده است روش تایپ‌بندی با DI بیشتر از ۰/۹ قابل قبول می‌باشد (۱۳). علاوه بر این ایزوله‌های با درصد تشابه بیش از ۸۰ درصد می‌تواند به عنوان سوش‌های یکسان در نظر گرفته شوند (۲۰). در مجموع این معیارها نشان می‌دهند که AP-PCR در مقایسه با پروفایل پلاسمید برای پسودوموناس آئروژینوزا قابل ترجیح می‌باشد (۱۱).

علاوه‌بر این، پروتکل AP- PCR دارای سرعت و قدرت تکرارپذیری بیشتری در مقایسه با تجزیه و تحلیل پروفایل پلاسمید می‌باشد. با این حال، تغییر در درجه حرارت مرحله اتصال (annealing)، غلظت dNTPs، MgCl2 و حتی دستگاه PCR می‌تواند قدرت تکرارپذیری AP-PCR را تحت تأثیر قرار دهد (۲۱ و ۲۲). مقایسه خوشه‌های ژنتیکی با استفاده از هر دو روش مولکولی درجه بالایی از شباهت را نشان داد. این نتایج نشان‌دهنده این موضوع است که تعداد محدودی از انواع رایج از تیپ‌ها باعث عفونت بیماران با پسودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان سوختگی می‌گردند و احتمالاً بین بیماران و بخش‌های مختلف منتقل می‌گردند. اگرچه برخی از ایزوله‌ها در گروه‌های مختلف خوشه قرار گرفته‌اند اما تشابه بیش از ۸۰ درصد این سویه‌ها نشان می‌دهد که این نمونه‌ها از تعداد محدودی از کلون‌های اولیه منشاء گرفته‌اند. این اختلاف ممکن است به علت تغییرات ژنتیکی است که در میان سوش‌ها روی می‌دهد اتفاقاتی مثل point mutation، Insertion و یا deletion که ممکن است در الگوی نمایان شود. در مطالعه انجام شده توسط پیرناری (Pirnary) و همکاران که بررسی ملکولار اپیدمیولوژی سویه‌های کلونیزه شده در بخش سوختگی بیمارستان پرداخته‌اند نشان داده شده است که دو ژنوتایپ غالب مسئول طغیان‌های جاری ناشی از ارگانیسم بوده و این دو سویه در واقع مسئول کلونیزاسیون در ۶۰ درصد از بیماران کلونیزه شده با پسودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان، بوده‌اند (۲). در مطالعه که در ایران انجام گرفته نشان داده شده که پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت‌های سوختگی، به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های تجویز شده مقاوم می‌باشند (۱ و ۲۳). استفاده میزان بالایی از آنتی‌بیوتیک برای درمان قربانیان سوختگی می‌تواند باعث انتخاب سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و انتقال آن به بیماران شود.

تفسیر باندهای حاصله از انجام پروفایل پلاسمیدی و AP-PCR بر روی سویه‌های جدا شده از بیماران و سویه‌های جدا شده از محیط بیمارستان نشان داد که ایزوله‌های بالینی و سویه‌های جداشده از محیط بیمارستان به احتمال فراوان از یک کلون میکروبی هستند و بیماران با سویه‌های ساکن در محیط بیمارستان کلونیزه می‌شوند. این سوبه‌ها به دلیل دارا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و به ویژه مقاومت به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در درمان بیماران از جمله کارباپنم‌ها که به عنوان آخرین خطوط درمانی در

Archive of SID

www.SID.ir

درمان عفونت‌ها استفاده می‌شوند درمان این بیماران را با مشکل مواجه کرده و با مرگ ومیر بالایی در این بیماران همراه است. منابع بیمارستانی و نیز محیط بیمارستان می‌توانند به عنوان منبعی برای این ارگانیسم پاتوژن عمل نمایند و سبب آلودگی بیماران بستری در بیمارستان که دارای وضعیت ایمنی پایینی می‌باشند، شوند. بسیاری از سوش‌های حساس پسودوموناس آئروژینوزا ممکن است در محیط بیمارستان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را از دیگر ارگانیسم‌های Nosocomial کسب نمایند و به ارگانیسم‌های مقاوم به درمان تبدیل شوند. استفاده از پروتکل‌های تایپینگ با قدرت تکرارپذیری بالا جهت بررسی طغیان‌ها عفونت‌های ناشی از سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو در بیمارستان‌های مختلف از جمله بیماران سوختگی بسیار حائز اهمیت بوده، زیرا این بررسی‌های ملکولار اپیدمیولوژیک کمک شایانی به کنترل به موقع این سویه‌ها می‌نماید (۱). از سوی دیگر بررسی آلودگی منابع دیگری نظیر مواد غذایی که ممکن است ارگانیسم‌های مختلف از این مسیر وارد محیط‌های بیمارستانی شده و بیماران را آلوده نمایند و نیز بررسی پروفایل آنتی‌بیوتیکی و نیز بررسی قرابت ژنتیکی این سویه‌ها با ایزوله‌های بیمارستانی به منظور کنترل و پیشگیری دارای اهمیت حیاتی است (۲۴ و ۲۵).

امروزه به دلیل وجود ارتباطات گسترده تجاری و توریستی بین کشورهای مختلف و نیز بین شهرهای مختلف در یک کشور بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا و مقاوم و به دارو ممکن است به راحتی در بین نقاط جغرافیایی انتقال یابند.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، همخوانی ژنتیکی بالا بین ایزوله‌های بالینی و محیط بیمارستان نشان می‌دهد که به احتمال فراوان این ایزوله‌ها از یک کلون میکروبی هستند و در واقع منشاء آلودگی بیماران همان سویه‌هایی هستند که در بیمارستان کلونیزه شده‌اند و بیماران سوختگی را آلوده می‌کنند. نتایج حاصل از این جنبه دارای اهمیت فراوان است که جهت جلوگیری از عفونی شدن بیماران با این سویه‌ها که معمولاً مقاومت چندداروی دارند ضروری است که پروتکل‌های ضدعفونی بخش‌های مختلف بیمارستان مورد بازنگری مجدد قرار گیرند و طوری طراحی شوند که به ریشه‌کنی این سویه‌ها از محیط بیمارستان سوختگی منتهی گردد. در نهایت رعایت همه این موازین منجر به آن خواهد شد که میزان مرگ ومیر در بیماران سوختگی و نیز هزینه‌های درمانی آنان کاهش یابد. اغلب آزمایشگاه‌های بالینی در ایران امکانات انجام مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی را نداشته و این امکانات تنها محدود به آزمایشگاه مرجع می باشد. از اینرو تأیید ارتباط بین ایزوله‌های جدا شونده در بیمارستان یا در طی طغیان‌ها بسیار مشکل است.

سپاس و قدردانی

از همکاری صمیمانه مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی (بیمارستان نمازی، شیراز) کمال تشکر و قدردانی را می‌نماییم.

References:

1.Anvarinejad M, Japoni A, Rafaatpour N, et al. Burn Patients Wounds Infected With Metallo-Beta-Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa: Multidrug Resistant Strains. Arch Trauma Res 2014; 3: e18182.

2.Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, et al.

www.SID.ir
Archive of SID

Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol 2003; 41:1192-202.

3.Shanthi J, Pazhanimurugan R, Gopikrishnan V, et al. Mechanism of drug resistance, characterization of plasmid-borne determinants and transformation study in P. aeruginosa from burn and ICU units-its susceptibility pattern. Burns 2013; 39: 643-9.

4.Fazeli H, Akbari R, Moghim S, et al. Pseudomonas aeruginosa infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. J Res Med Sci 2012; 17: 332-7.

5.Wolska K, Kot B, Jakubczak A. Phenotypic and genotypic diversity of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitals in siedlce (Poland). Braz J Microbiol 2012; 43: 274-82.

6.Mardaneh J, Ahmadi K, Jahan Sepas A. Determination antimicrobial resistance profile of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in Taleghani Hospital (Ahvaz, Iran) from 2011-2012. J Fasa Univ Med Sci 2013; 3: 188-93.(Persian)

7.van Mansfeld R, Jongerden I, Bootsma M, et al. The population genetics of Pseudomonas aeruginosa isolates from different patient populations exhibits high-level host specificity. PloS One 2010; 5: e13482.

8.Anvarinejad M, Farshad S, Alborzi A, et al. Integron and genotype patterns of quinolones-resistant uropathogenic Escherichia coli. African J Microbiol Res 2011; 5:3736-70.

9.Strandén A, Frei R, Widmer AF. Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis? J Clin Microbiol 2003; 41: 3181-6.

10.Gad GF, El-Domany RA, Zaki S, et al. Characterization of Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 1010-7.

11.Jasemi SS, Alipoor F, Dehbashi S, Mardaneh J. Isolation *Pseudomonas* and *Acinetobacter* from Blood Specimens in Patients Hospitalized in Emam Khomeini Hospital (Kermanshah). ISMJ 2015; 18: 323-33.

12.Birnboitm H, Doly JA. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuclei Acids Res 1979; 7: 1513-23.

13.Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discrimination ability of typing system: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 26: 2465-6.

14.Alfizah H, Nordiah AJ, Rozaidi WS. Using pulsed-field gel electrophoresis in the molecular investigation of an outbreak of Serratia marcescnes infection in an intensive care unit. Singapore Med J 2004; 45: 214-8.

15.Hansen WL, Beuving J, Bruggeman CA, et al. Molecular probes for diagnosis of clinically relevant bacterial infections in blood cultures. J Clin Microbiol 2010; 48:4432-8.

16.Spilker T, Coenye T, Vandamme P, et al. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2004; 42: 2074-9.

17.Fiett J, Baraniak A, Mrowka A, et al. Molecular epidemiology of acquired-metallo beta-lactamase-producing bacteria in Poland. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 880-6.

18.Curran B, Jonas D, Grundmann H, et al. Development of a multi locus sequence-typing scheme for the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 2004; 42: 5644-9.

19.Anvarinejad M, Farshad S, Ranjbar R, et al. Genotypic Analysis of E. coli Strains Isolated from Patients with Cystitis and Pyelonephritis. Iran Red Crescent Med J 2012; 14: 408-16.

20.Valdezate S, Vindel A, Martin-Davila P, et al. High genetic diversity among Stenotrophomonas maltophilia strains despite their originating at a single hospital. J Clin Microbiol 2004; 42: 693-9.

21. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, et al. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. J Clin

Archive of SID

www.SID.ir

Microbiol 1997; 35: 339-46.
22.Ghazi F, Benmechernene Z, Kihal M, et al. The reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of Streptococcus thermophilus strains with XD9, M13 and OPI-02 MOD primers. African J Biotech 2013; 12: 6245-52.
23.Japoni A, Alborzi A, Kalani M, et al. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in the South of Iran. Burns 2006; 32: 343-7.
24.Mardaneh J, Soltan Dallal MM. Isolation and Identification of *E. cowanii* from Powdered Infant Formula in NICU and Determination of Antimicrobial Susceptibility of Isolates. Iran J Pediatr 2014; 24: 261-6.
25.Dai W, Simkhovich BZ, Kloner RA. Ischemic preconditioning maintains cardioprotection in aging normotensive and spontaneously hypertensive rats. Exp Gerontol 2009; 44: 344-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burn Patients in South of Iran

A. Japoni [1], M. Anvarinejad [1], J. Mardaneh [2]*

[1] Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

[2] Department of Microbiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

(Received 22 Jul, 2014 Accepted 15 Oct, 2014)

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main etiological agents in burn infections which could be life threatening for the infected patients. The aim of the present study was to identify and track source of infections using two molecular typing methods.

Materials and Methods: Seventy-four strains of *P. aeruginosa* were isolated from burn patients and hospital environment in Ghotbadden Burn Hospital, Shiraz, Iran. Isolates were typed by arbitrary primed-polymerase chain reaction (AP-PCR) and plasmid profiling. Similarity and clustering of the strains was assessed using NTSYS-PC software and photo Capt Mw program.

Results: Thirty eight plasmid profiles were obtained and classified them into: 2, 3and 5 clusters, based on 50%, 64.7% and 67.5% similarity on the plotted dendrogram, respectively. Drawn dendrogarm categorized AP-PCR products to 47 different types.

Conclusion: Based on these results, a limited number of *P. aeruginosa* types are predominant in the hospitals which infect the burn patients. To control of the infections in patients with antibiotics, resistant isolates, strong disinfection of patients' bathroom after scrubbing of patients wounds, should be implemented.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Plasmid typing, Source of infections, AP-PCR.

**Address for correspondence:* Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. Email: anvarinejad@yahoo.com.

Archive of SID
www.SID.ir