Archive of SID

مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره دوم (پیاپی ۲۷) تابستان ۱۳۹۵
صفحات ۱۰۷-۹۶

Original Article

ژنوتایپینگ جدایه های *سودوموناس آئروژینوسای* جدا شده از عفونت های بیمارستانی

غلامرضا بنی شریف[۱]، حسن ممتاز[۲*]

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

چکیده

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروژینوسا* یک پاتوژن فرصت طلب شایع بیمارستانی است که مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های انسانی می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف دسته بندی ژنتیکی جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* جدا شده از عفونت های بیمارستانی انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه مقطعی توصیفی بر روی ۱۸ جدایه *سودوموناس آئروژینوسا* جداسازی شده از بیماران بستری در بیمارستان های سطح شهرستان شهرکرد انجام گرفت. به منظور ژنوتایپینگ آن ها از سه روش RAPD-PCR، ERIC-PCR و Rep-PCR استفاده گردید.

یافته ها: در آزمون RAPD-PCR، ۸۶ باند مختلف DNA از حدوداً ۳۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز در جدایه های مورد بررسی ایجاد شد. از این میان تعداد ۷۴ باند از آن ها پلی مورفیک بود. در آنالیز جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* با روش ERIC-PCR تعداد ۹۸ باند مختلف با حدود ۱۵۰ تا ۸۰۰۰ جفت باز مشاهده شد که الگوی باندینگ ۱۴ جدایه از ۱۸ جدایه مورد بررسی پلی مورفیک بود. در آزمایش Rep-PCR، ۱۶پروفایل ژنومی حاصل گردید که در مجموع شباهتی بین حدود ۳۰ تا ۸۶ درصد بین جدایه ها مشاهده شد و تعدادی از نمونه ها دارای شباهت ۱۰۰ درصد بودند.

نتیجه گیری: به طور کلی تمام جدایه های مورد بررسی دارای الگوی باندی پلی مورفیک بودند. هیچ باند مونوفورمیکی در جدایه ها مشاهده نشد. وجود الگوی باندی پلی مورفیک در استفاده از تکنیک های مورد بررسی نشان می دهد که سرعت بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم *سودوموناس آئروژینوسا* وجود دارد و روش های مورد استفاده در این مطالعه هر کدام ابزارهایی قدرتمند در دسته بندی *سودوموناس آئروژینوسا*می باشند.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروژینوسا*، عفونت های بیمارستانی، RAPD-PCR، ERIC-PCR، Rep-PCR.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۴

مقدمه

سودوموناس آئروژینوسا (*Pseudomonas aeruginosa*) یکی از عوامل بیماری زای شایع در محیط های بیمارستان است که سبب عفونت های متعدد مانند عفونت های دستگاه ادراری، عفونت های سیستم تنفسی، عفونت های دستگاه معده و روده و آماس پوست می شود. همچنین این باکتری مشکل اصلی برای افراد بستری مبتلا به سرطان فیبروز کیستی و سوختگی ها محسوب می گردد. بر همین اساس سویه هایی از این باکتری توانایی قابل توجهی در استقرار در تعدادی از سطوح مخاطی را دارا می باشند (۱ و ۲). بنابراین آگاهی از چگونگی انتشار سویه های این باکتری از اهمیت اپیدمیولوژیک ویژه ای به منظور یافتن منبع عفونت، چگونگی انتشار سویه ها و کنترل شیوع باکتری بیماری زا به خصوص سویه های مقام نسبت به داروها برخوردار است (۱).

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۴۵ پست الکترونیک: drhasanmomtaz@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

بر همین اساس به منظور اهداف اپیدمیولوژی، روش های مختلفی برای طبقه بندی میکروارگانیسم ها وجود دارد. به گونه ای که طبقه بندی *سودوموناس آئروژینوسا* برای اهداف اپیدمیولوژیکی بر اساس روش های قدیمی، در راستای ویژگی های فنوتیپی باکتری مانند حضور لیپوپلی ساکارید در سرم، آسیب پذیر بودن باکتری نسبت به فاژ و عوامل ضد میکروبی و پروفایل های تولید توکسین می کند (۳). بی ثباتی خصوصیات در شرایط محیطی متفاوت از عوامل اصلی نامساعد در سنجش های فنوتیپی می باشد. به طوری که این موارد مانع تعیین مشخصات معین سویه ها بر اساس خصوصیات ظاهری می گردد (۱ و ٤). امروزه روش های مولکولی یا در واقع روش های انگشت نگاری ژنومی به عنوان دقیق ترین روش ها برای طبقه بندی میکروارگانیسم ها در جهت اهداف اپیدمیولوژیک تلقی می گردند (۵ و ٦). روش های مولکولی قدرت تشخیص و تکرار پذیری بسیار بالایی نسبت به روش های سنجش فنوتیپی دارند. همچنین از توانایی بالایی در تعیین تفاوت های ژنومی کوچک و ثبات مولکولی بالا در مقایسه با سنجش های فنوتیپی همان گونه باکتری برخوردار می باشند (۷ و ۸).

در حال حاضر چندین روش انگشت نگاری ژنومی به منظور دسته بندی انواع جدایه های بالینی *سودوموناس آئروژینوسا* وجود دارد که شامل تکنیک های زیر می باشند: ژل الکتروفورز میدان ضربه ای (Pulsed field gel electrophoresis= PFGE)، روش ریبوتایپینگ، روش های انگشت نگاری بر اساس PCR که به دو صورت روش های تیپ بندی قدیمی مبتنی بر PCR مانند RFLP (Restriction fragment length polymorphism)، افزایش و توسعه تصادفی DNA چند گانه (RAPD Random amplified polymorphic DNA=)، استفاده از گروهی از عناصر تکراری که در واقع توالی های توافقی تکراری انتروباکتریال می باشند و متداول در باکتری های روده ای گرم منفی با عنوان ERIC (consensus sequences *Enterobacterial* repetitive intergenic) شناخته می شود.

روش طبقه بندی توالی های چندین لوکوس (MLST= typing Multilocus sequence) و در نهایت تکنیک هایی مانند Rep-PCR و BOX-PCR از جمله روش های تیپ بندی مولکولی محسوب می شوند (۱ و ۹). کاربرد برخی از این روش ها در آزمایشگاه های میکروب شناسی بالینی محدود شده است. زیرا بسیاری از آن ها زمان بر است و به مهارت زیادی نیاز دارند. به عنوان نمونه ژل الکتروفورز میدان ضربه ای (PFGE) به عنوان یک استاندارد و معیار برای تعیین ویژگی های ژنوتیپی تلقی می شود و در سراسر جهان کاربرد زیادی دارد. با این وجود روش یا شده کند، پر هزینه و پرزحمت است. همچنین نیازمند مقادیر نسبتاً زیادی DNA می باشد و از طرفی تجهیزات آن نیز گران قیمت است (۱۰).

از طرفی دیگر، تکنیک ریبوتایپینگ نیاز به پروب های اختصاصی ژن دارد. بنابراین به نظر می رسد که روش های RAPD-PCR و ERIC-PCR برای مطالعه اپیدمیولوژی *سودوموناس آئروژینوسا* مناسب باشند. روش RAPD-PCR یکی از سریع ترین روش های تایپینگ مولکولی است. در سال های اخیر به دلیل سادگی این روش، سرعت و دقت بالا، قابلیت تکرار پذیری، هزینه نسبتاً پایین و قدرت بالا در افتراق بین سویه ای مورد استفاده ویژه ای قرار گرفته است (۹).

علاوه بر تکنیک RAPD-PCR، تکنیک ERIC-PCR به منظور مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می گیرد. ارزیابی و سنجش های مبتنی بر REP-PCR (Repetitive element based PCR-) استفاده از پرایمرهایی می باشد که هدف آن ها توالی های تکراری حفاظت شده در ژنوم باکتری می باشد. از جمله گروه هایی از عناصر تکراری، توالی های تکراری توافقی درون ژنی انتروباکتریال یا ERIC می باشد (۱۱). به طور کلی اجزا و عناصر ۱۲٦ جفت بازی، ERIC شامل یک نمونه تکراری معکوس مرکزی بسیار حفاظت شده در مناطق فرا ژنی است که از این توالی تکراری به منظور طراحی پرایمر در تکنیک ERIC-PCR به منظور به دست آوردن انگشت نگاری DNA استفاده می شود (۳).

Rep-PCR روشی برای نشانه گذاری ژنوم های باکتریایی است

www.SID.ir

Archive of SID

که الگوهای خاص سویه به دست آمده از PCR عناصر DNA تکراری موجود درون ژنوم های باکتریایی را مورد بررسی قرار می دهد. سه مجموعه اصلی عناصر تکراری برای اهداف تایپینگ استفاده می شوند: توالی پالیندرومیک برون ژنی تکراری (Rep)، توالی اجماع درون ژنی تکراری انتروباکتریایی (ERIC) و عناصر BOX. ثابت شده است که روش های Rep-PCR و ERIC-PCR برای جداسازی و تعیین انواع *سودوموناس آئروژینوسا* مفید می باشند (۱۲ و ۱۳). هدف از این مطالعه استفاده از سه روش RADP-PCR، ERIC-PCR و Rep-PCR در ژنوتایپینگ جدایه های *سودوموناس آئروژینوسای* جدا شده از انواع عفونت های بیمارستانی در شهرکرد بود.

مواد و روش ها

الف) جدایه های باکتریایی: در این مطالعه مقطعی توصیفی، تعداد ۱۸ جدایه *سودوموناس آئروژینوسا* که از عفونت های مختلف بیمارستانی شامل ۵ جدایه از زخم های چرکی، ۳ جدایه از عفونت های تنفسی، ۳ جدایه از زخم بستر، ٤ جدایه از موارد سوختگی و ۳ جدایه از عفونت های دستگاه ادراری در بیمارستان های آیت الله کاشانی و هاجر شهرستان شهرکرد در فاصله زمانی تیر ماه ۱۳۹۳ تا خرداد ماه ۱۳۹٤جدا شده بودند انتخاب گردید. این جدایه ها در آزمایشگاه های میکروب شناسی بیمارستان ها و مراکز درمانی مربوطه جداسازی و تعیین هویت شده بودند.

ب) تائید قطعی سودوموناس آئروژینوسا : برای این منظور از روش PCR با ردیابی ژن *nanI* استفاده شد. در ابتدا DNA ژنومی از جدایه های رشد یافته در محیط TSB با استفاده از کیت استخراج DNA (Genomic DNA Purification) (فرمنتاس–لیتوانی) استخراج گردید. به منظور ردیابی ژن *nanI* و تائید وجود *سودوموناس آئروژینوسا* از پرایمر های Nan F: 5'TTGCTGAGCCAAGTTTAGG3' و nan R: 5'TGAGCTACAGACCCAATCGTC3' معرفی شده توسط استراتوا (Strateva) و همکاران (۲۰۰۸) استفـاده شد (١٤). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۲ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرو مول dNTPs Mix (فرمنتاس– لیتوانی)، ۱ میکرومول از هر کدام از پرایمرها، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاس–لیتوانی) و ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Germany، Flex Clcler) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۲۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۳ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

ج) روش RAPD-PCR: برای این منظور از پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی ۲۷۲ با توالی AGCGGGCCAA معرفی شده توسط ماهنتیرا لینگام (Mahenthiralingam) و همکاران (۱۹۹٦) استفاده گردید (۱۵). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۳ میلی مول $Mgcl_2$، ۲۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۱/۵ میکرو مول پرایمر ۲۷۲، ٤ واحد آنزیم Taq DNAPolymerase و ۳ میکرولیتر DNA مربوط به هر جدایه انجام شد. برنامه حرارتی شامل ٤ چرخه تکراری ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳٦ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه تکراری ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، ۳٦ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه، ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود.

د)روش (Rep-PCR): این آزمایش با کمک یک پرایمر BOX باتوالی'5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3 معرفی شده توسط ولسکا (Wolska) و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد (۱۳). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۲۰ میلی مول $MgCl_2$، ۲۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۱ میکرومول از پرایمر BOX، ۱/۵

www.SID.ir

Archive of SID

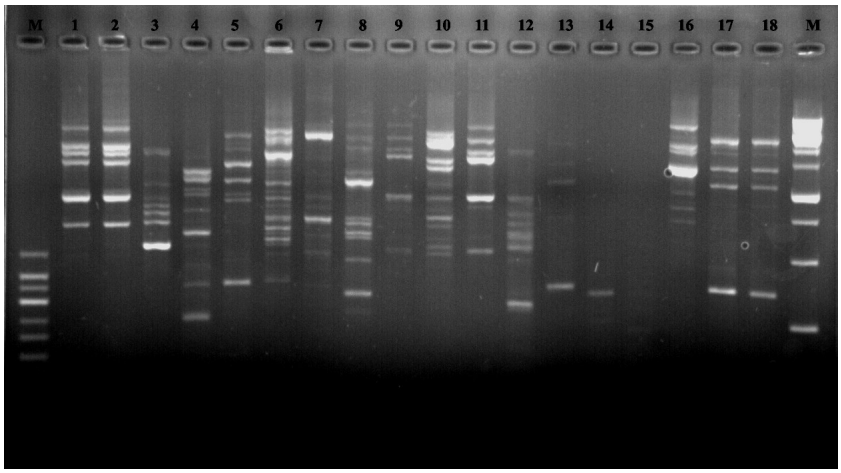
واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه انجام شد. چرخه دمایی مورد استفاده شامل یک سیکل ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه تکراری حرارتی با دمای ۹۵ درجه سلیسیوس ۱ دقیقه، ٤۸ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه، ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه بود.

ه) *روش ERIC-PCR*: به منظور دسته بندی ژنتیکی جدایه های *سودوموناس آئروژینوسای* از روش توصیه شده توسط ولسکا (Wolska) و زودا (Szweda) در سال ۲۰۰۸ استفاده گردید (۱٦). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ٤ میلی مول $Mgcl_2$، ۳۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۱/۵ میکرومول از پرایمرهای ERIC1: CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA و ERIC2: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG، ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۳ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه انجام شد. چرخه دمایی مورد استفاده شامل یک سیکل ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه تکراری حرارتی با دمای ۹٤ درجه سلیسیوس ۱ دقیقه، ۵۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. به منظور ارزیابی محصول PCR در هر کدام از روش های یاد شده از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۲ درصد آگاروز استفاده شد.

و) *تجزیه و تحلیل اطلاعات*: در این مطالعه هر کدام از آزمایش های یاد شده با ۳ بار تکرار انجام گرفت تا از تعداد باندهای ایجاد شده توسط هر جدایه اطمینان حاصل گردد. آنالیز تصاویر حاصل از الکتروفورز نمونه های مورد مطالعه با کمک نرم افزار بایونیومریک (Bionumeric) (V.7.5) انجام شد. سپس دندروگرام مربوط به آنالیز داده های حاصل از هر کدام از روش های ژنوتایپینگ جداگانه ترسیم گردید.

یافته ها

در مطالعه حاضر الگوی باندینگ ۱۸ جدایه *سودوموناس آئروژینوسا* جدا شده از انواع عفونت های بیمارستانی با سه روش RAPD-PCR، ERIC-PCR و Rep-PCR مورد بررسی قرارگرفت. آزمایش RAPD-PCR با استفاده از پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی ۲۷۲ انجام شد که همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می شود ۸٦ باند مختلف DNA از حدوداً ۳۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز در جدایه های مورد بررسی ایجاد گردید. از این میان تعداد ۷٤ باند آن پلی مورفیک بود. این امر نشان دهنده درجه بالایی از پلی مورفیسم در بین نمونه های بررسی شده بود. با استفاده از نتایج آنالیز الگوی باندینگ جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* در روش RAPD-PCR مشخص

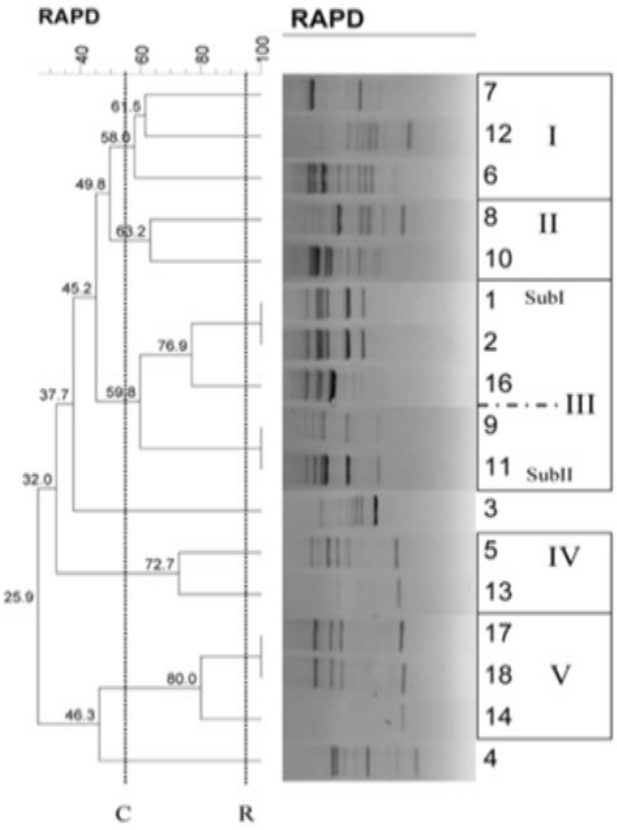


شکل ۱: تصویر الکتروفورز محصول RAPD-PCR مربوط به جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* . M در سمت چپ) مارکر ۵۰ جفت بازی، M در سمت راست) مارکر ۱ کیلو جفت بازی.

www.SID.ir

Archive of SID

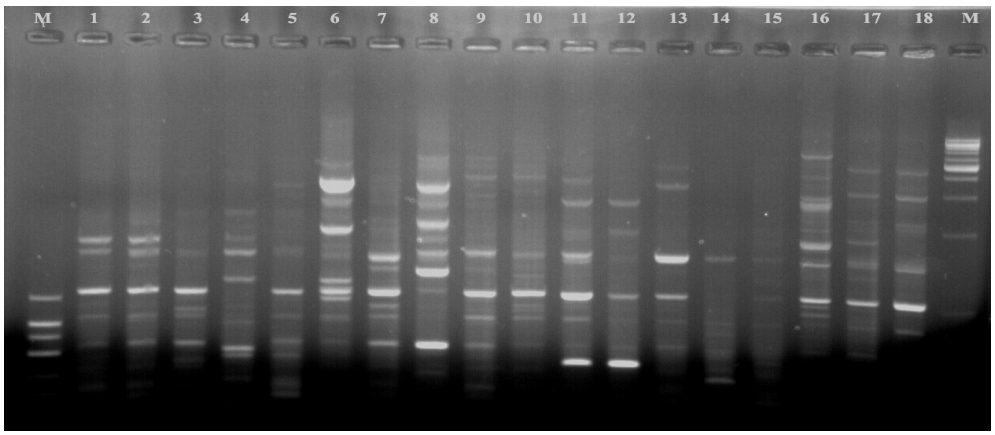
گردید که جدایه ها در ۷ کلاستر و ۲ زیرکلاستر دسته بندی می شوند (شکل ۲). در این شکل کلاسترها با حروف یونانی و کلاسترهای تک عضوی (جدایه های شماره ۳ و ٤) با شماره جدایه مربوطه مشخص شده اند. هر کلاستر بر اساس شباهت ۵۵ درصدی و تکرار پذیری ۹۵ درصدی دارای



شکل ۲: دندروگرام حاصل از آنالیز الگوی باندینگ جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* در آزمایش RAPD-PCR.

تعدادی عضو (جدایه) می باشد. در مجموع ١٤ الگوی ژنومی (پروفایل ژنتیکی) مشاهده شد که هر الگو بر اساس درصد شباهت گفته شده در کلاستر مجزایی قرار گرفته است. بزرگترین کلاستر ایجاد شده کلاستر شماره III با ۵ عضو بود که جدایه های آن در دو زیر کلاستر SubI (جدایه های ۱ و ۲ جدا شده از زخم های چرکی و ١٦ جدا شده از عفونت تنفسی) و SubII (جدایه های ۹ جدا شده از زخم بستر و ۱۱ جدا شده از زخم های چرکی) با درصد تشابه ۵۹/۸ درصد قرار گرفتند. تعدادی از جدایه ها دارای تشابه ژنتیکی ۱۰۰ درصد بودند که شامل جدایه های ۱ و۲ (جدا شده از زخم های چرکی) در زیر کلاستر I از کلاستر شماره III، جدایه های ۹ و ۱۱ (جدا شده از زخم های چرکی و زخم بستر) در زیر کلاستر II از کلاستر شماره III و جدایه های ۱۷ و ۱۸ (جدا شده از عفونت های تنفسی) در کلاستر شماره V بودند.

در آنالیز جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* با روش ERIC-PCR تعداد ٦٣ باند مختلف با حدود ۱۵۰ تا ۸۰۰۰ جفت باز مشاهده شد که الگوی باندینگ ١٤ جدایه از ۱۸ جدایه مورد بررسی پلی مورفیک بود (شکل ۳). در بررسی الگوی دندروگرامی این جدایه ها با کمک نرم افزار Bionumeric ۵ کلاستر و ۲ زیر کلاستر مشاهده شد و چهار جدایه ٦ (جدا شده از زخم بستر)، ١٦، ١٧و ۱۸ (جدا شده از عفونت های تنفسی) در کلاستر هایی مجزا و تک عضوی قرار گرفتند که در تصویر دندروگرام با شماره جدایه مربوطه

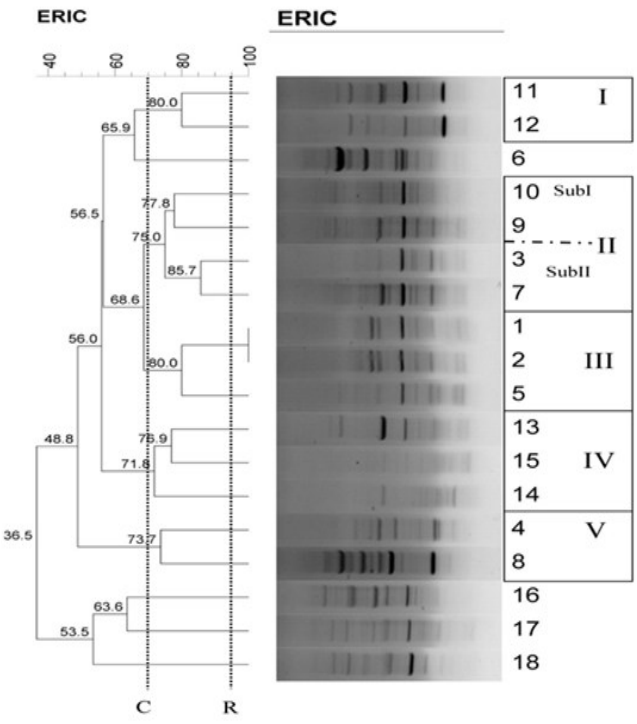


شکل ۳: تصویر الکتروفورز محصول ERIC-PCR مربوط به جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا*. M در سمت چپ) مارکر ۵۰ جفت بازی، M در سمت راست) مارکر ۱ کیلو جفت بازی.

www.SID.ir

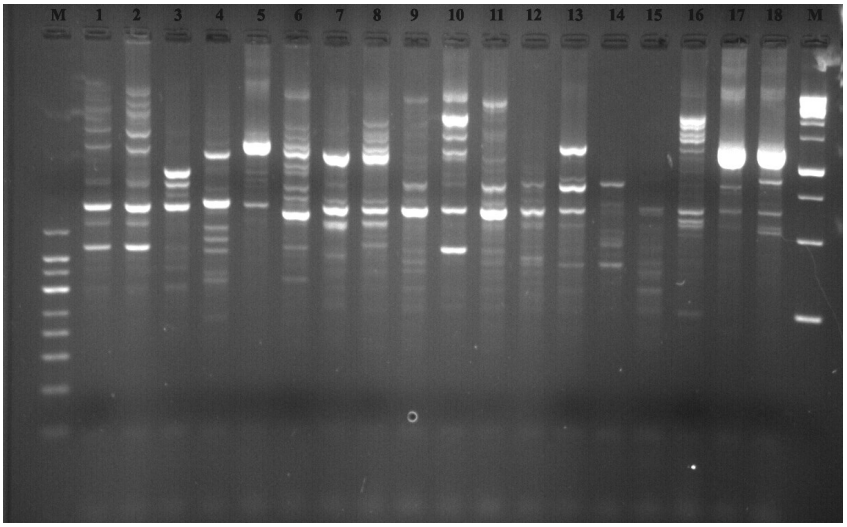
Archive of SID

مشخص شده اند (شکل ٤). این الگوی کلاسترینگ بر اساس شباهت ۵۵ درصدی و تکرار پذیری درصدی جدایه های حاصل شد. در مجموع تشابهی بین ۳٦/۵ تا حدود ۸٦ درصد بین ۱۸ جدایه مورد مطالعه وجود داشت. این امر موجب شد که در مجموع ۱۷ الگوی ژنتیکی (پروفایل) حاصل گردد.



شکل ۴: دندروگرام حاصل از آنالیز الگوی باندینگ جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* در روش ERIC-PCR.

هر پروفایل بر اساس درصد شباهت یاد شده در کلاستری مجزا قرار گرفت. در آزمایش ERIC-PCR تنها ۲ جدایه ۱ و ۲ (جدا شده از زخم های چرکی) دارای شباهت ۱۰۰ درصدی بودند که در کلاستر شماره III قرار گرفتند. ژنوتایپینگ جدایه های *سودو موناس آئروژینوسا* با روش Rep-PCR با استفاده از تک پرایمر BOX انجام گرفت. در این روش با انجام آزمایش PCR بر روی ۱۸ جدایه مورد مطالعه در مجموع ٦۳ باند (قطعه DNA) تکثیر شده با وزن های حدوداً ۲۰۰ تا بالای ۱۰۰۰۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۵). الگوی دندروگرام حاصل از آنالیز باندینگ جدایه ها با این روش در شکل ٦ آورده شده است. در این مطالعه تعداد ۱۸ جدایه مورد مطالعه در ٦ کلاستر I تا Vi دسته بندی شدند. دو جدایه ١٤ و ۱۵ در کلاستر جداگانه تک عضوی قرار گرفتند که در الگوی دندروگرام با شماره جدایه مشخص شده است. هر کلاستر بر اساس شباهت ۵۵ درصدی و تکرارپذیری ۹۵ درصدی دارای تعدادی عضو می باشد. در این میان کلاستر I دارای دو جدایه ۸ (جدا شده از موارد سوختگی) و ١٦ (جدا شده از عفونت های تنفسی)، کلاستر II دارای دو جدایه ۱ و ۲ (جداشده از زخم های چرکی)، کلاستر III دارای سه جدایه ٦، ۹ و ۱۰ (جدا شده از زخم بستر)، کلاستر IV با دو جدایه ۱۷ و ۱۸ (جدا شده از عفونت های تنفسی)، کلاستر V با



شکل ۵: تصویر الکتروفورز محصول Rep-PCR مربوط به جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا*. M در سمت چپ) مارکر ۵۰ جفت بازی، M در سمت راست) مارکر ۱ کیلو جفت بازی.

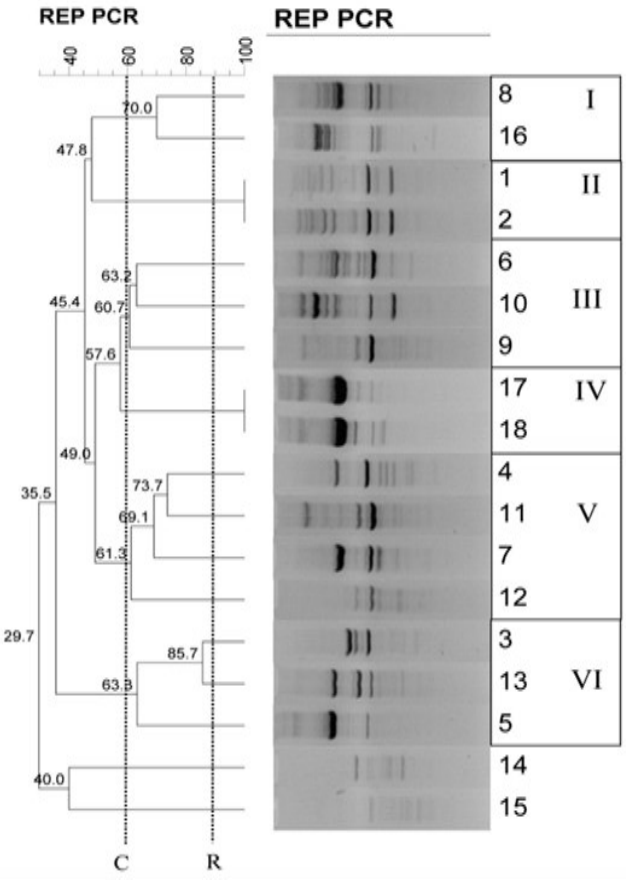
www.SID.ir

Archive of SID

٤ جدایه ٤ و ٧ (جدا شده از موارد سوختگی) و ١١ و ١٢ (جدا شده از زخم های چرکی) و کلاستر VI دارای سه جدایه ٣ (جدا شده از سوختگی)، ٥ (جدا شده از زخم های چرکی) و ١٣ (جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری) می باشند. در این آزمایش ١٦ الگوی ژنومی حاصل گردید. در مجموع شباهتی حدود ٣٠ تا ٨٦ درصد بین آنها مشاهده شد. تعدادی از این جدایه ها شامل جدایه های ١ و ٢ در کلاستر II و ١٧ و ١٨ در کلاستر IV دارای شباهت ١٠٠ درصدی بودند.

بحث

سودوموناس آئروژینوسا شایع ترین عامل بیماری زا در جنس *سودوموناس* است که با ایجاد بیماری هایی مانند فیبروز سیستیک، بیماری نئوپلاسمی و سوختگی های شدید موجب مرگ و میر فراوان می گردد (١٧ و ١٨). در دهه های اخیر



شکل ۶: دندروگرام حاصل از آنالیز الگوی باندینگ جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* در روش Rep-PCR.

این باکتری نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم شده و عدم موفقیت در درمان عفونت های ناشی از آن *سودوموناس آئروژینوسا* را به عنوان یکی از مهم ترین پاتوژن های بیمارستانی معرفی کرده است (١٩). *سودوموناس آئروژینوسا* از مکانیسم ها مختلفی استفاده کرده تا از اثرات زیان بار آنتی بیوتیک ها در امان بماند. بنابراین با توجه به اهمیت تشخیص سریع این باکتری و مشکلات خاص در تشخیص بیوشیمیایی آن، این باکتری مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور دسته بندی ژنتیکی این باکتری از روش های مختلفی مانند ریبوتایپینگ، PFGE، انگشت نگاری به کمک PCR و MLST استفاده شده است (١ و ٩). در مطالعه حاضر از ٣ روش مبتنی بر PCR یعنی ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR به منظور ژنوتایپینگ جدایه های *سودوموناس آئروژینوسا* استفاده شد و الگوی ژنومی جدایه های جدا شده از انواع عفونت های بیمارستانی شامل زخم های چرکی، عفونت های دستگاه تنفسی، زخم بستر، سوختگی و عفونت های دستگاه ادراری با دو روش یاد شده ارزیابی گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که جدایه های مورد مطالعه در هر یک از ٣ روش مورد استفاده دارای الگوی باندی (قطعات تکثیر شده DNA) متفاوتی هستند. این تنوع در تعداد باندها می تواند مربوط به توالی پرایمر مورد استفاده، دسترسی به مکان های متعدد اتصال پرایمر در ژنوم و یا کیفیت الگو باشد. تمام جدایه های مورد بررسی دارای الگوی باندی پلی مورفیک بودند. و هیچ مونوفورمیک باندی برای هیچ کدام از جدایه ها مشاهده نشد. وجود الگوی باندی پلی مورفیک در استفاده از تکنیک های به کار برده شده نشان می دهد که سرعت بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم *سودوموناس آئروژینوسا* وجود دارد. این یک سازگاری واقعی در این باکتری با ژنومی به طول ٥٥٧٠ فریم خوانش را پیش بینی می کند (٢٠).

نکته مهم آن که در تفسیر نتایج حاصل از تکنیک های یاد شده جدایه هایی که دارای الگوی باندی کاملاً یکسانی باشند و هیچ تفاوتی در تعداد و اندازه قطعات تکثیر شده DNA نداشته باشند، یک کلون محسوب می شوند. کلنی دارای بیشترین

www.SID.ir

Archive of SID

فراوانی را کلون A می نامند و جدایه هایی را که در ۲ تا ۳ باند با کلون A تفاوت داشته باشند کلون A1، جدایه هایی که دارای ٤ تا ٦ باند متفاوت باشند کلون A2 و جدایه هایی با حداقل ۷ باند متفاوت را کلون نامرتبط محسوب می کنند (۲۱). اوکارول (O'Carroll) و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بررسی ۱٦۳ جدایه *سودوموناس آئروژینوسای* جدا شده از ۱۰۰ بیمار با استفاده از ۲ تکنیک ERIC-PCR و RAPD-PCR نشان دادند که هر کدام از جدایه ها که تعداد ۲ یا بیشتر از ۲ باند مختلف با سایر جدایه ها داشته باشد را می توان به عنوان یک دسته جدید محسوب نمود (۲۲). به عبارتی می توان چنین گفت که تغییر در سایت اتصال پرایمر (و یا در روش RFLP تغییر در سایت شناسایی آنزیم اندونوکلئاز) منجر به تغییر باند نسبت به باند اولیه و تغییر در الگوی باندینگ جدایه می گردد. بنابراین اگر تفاوت عمده ای در الگوی باندینگ جدایه ها مشاهده نشود، می توان گفت که این جدایه ها از منشاء واحدی هستند و ژنوم آن ها در طول زمان به دلیل رویدادهای ژنتیکی مانند جهش های نقطه ای، الحاق شدن و یا ترادف نوکلئوتیدی در ژنوم با سویه منشاء کمی تفاوت کرده است. در مطالعه حاضر که بر روی ژنوتایپینگ ۱۸ جدایه *سودوموناس آئروژینوسا* جدا شده از انواع عفونت های بیمارستانی انجام گرفت، در آنالیز الگوی باندینگ ایجاد شده در ۲ روش RAPD-PCR و ERIC-PCR بر اساس تکرار پذیری ۹۵ درصدی و شباهت ۵۵ درصدی با نرم افزار Bionumeric، ١٤ الگوی مختلف در تکنیک RAPD-PCR، ۱۷ الگو در تکنیک ERIC-PCR و ١٦ الگوی مختلف در تکنیک Rep-PCR در بین جدایه ها مشاهده شد. به طوری که کلون غالب (Clone Group Major) در تکنیک RAPD شامل کلاستر III، در روش ERIC-PCR کلاستر II و در تکنیک Rep کلاستر V بود. همچنین در مقایسه جدایه ها با یکدیگر در سه تکنیک مورد بررسی، جدایه های ۱ و ۲ در یک گروه مشابه قرار گرفتند که نشان دهنده پلی مورفیسم مشابه این دو جدایه می باشد. دلیل این مساله جداسازی این دو جدایه از نواحی یکسان (هر دو از موارد زخم های چرکی) بود. ولسکا (Wolska) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی ٦۲ جدایه *سودوموناس آئروژینوسای* جدا شده از دو بیمارستان در هلند با به کار گیری پرایمر BOX در روش Rep-PCR، ۷ ژنوتیپ و ۳۱ الگوی باندینگ متفاوت را در جدایه ها نشان دادند. محققین یاد شده نشان دادند که سویه های *سودوموناس آئروژینوسای* جدا شده از مدفوع از تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی پایین تری نسبت به جدایه های نمونه های بالینی دارد (۱۳). سیرمیس (Syrmis) و همکاران در سال ۲۰۰٤ با انجام تکنیک Rep-PCR بر روی ۱٦۳ سویه *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از ۵۰ بیمار بالغ و ۵۰ نوزاد نشان دادند که نتایج Rep-PCR با PFGE مشابهت دارد و این تکنیک ها ابزاری مهم برای دسته بندی انواع جدایه های بالینی *سودوموناس آئروژینوسا* جدا شده از بیماران *مبتلا به* فیبروز کیستی دارد (۲۳). ولسکا (Wolska) و همکاران در سال ۲۰۱۳ از تکنیک AP-PCR به منظور ژنوتایپینگ ٤٤ سویه *سودوموناس آئروژینوسا* استفاده نمودند. در این بررسی ۱۵ ژنوتیپ مختلف شناسایی گردید که ژنوتیپ A با فراوانی ۲۷/۳ درصد غالب بود (۱). در ایران نیز مطالعات مختلفی با به کارگیری انواع روش های ژنوتایپینگ بر روی *سودوموناس آئروژینوسا* انجام شده است. سلیمی (Salimi) و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تهران، ۸ ژنوتیپ متفاوت با پلی مورفیسم ٦ درصدی را در جدایه های *سودوموناس آئروژینوسای* جدا شده از بیماران سوختگی با روش RAPD-PCR شناسایی نمودند (۱۱). بر اساس مطالعاتی که در گذشته انجام شده میزان بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم این باکتری گزارش شده است (۲۰). ارتباط بین نتایج روش های به کار برده شده نشان می دهد که در جدایه های *سودوموناس آئروژینوسای* جدا شده پلی مورفیسم زیادی دارند که ظاهراً به دلیل سرعت بالا در تغییرات ژنتیکی است. این تنوع بالا ممکن است یکی از مزایای انتخابی برای یک سویه باشد تا خود را به محیط عادت دهد و می تواند برای انتشار و اهلی شدن سویه های وحشی مفید باشد. تنوع ژنتیکی می تواند ناشی از استقرار متقاطع یا آلودگی با منبع یکسان یا کسب ژن های مستقل از سویه های محیطی

www.SID.ir

Archive of SID

باشد. انتقال بیمار به بیمار نیز هر چند احتمال پائینی دارد، اما احتمال آن صفر نیست. تائید انتقال آلودگی متقاطع به طور دقیق و صحیح امکان پذیر نمی باشد. زیرا عوامل مختلفی در این امر دخالت دارند و وجود هر یک از الگوهای باندینگ در باکتری *سودوموناس آئروژینوسا* می تواند سویه محیطی غالب در یک مکان را نشان دهد.

نتیجه گیری

در مقایسه روش های مختلف ژنوتایپینگ عوامل عفونی، سهولت در انجام کار و به کار گیری روش مورد نظر حائز اهمیت است. از طرف دیگر هرچه تعداد باندهای ایجاد شده برای یک جدایه در یک تکنیک بیشتر باشد امکان افتراق بین سویه ها افزایش می یابد. بنابراین با توجه به دو مورد یاد شده و بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه روش Rep-PCR روش مناسب تری برای تایپینگ و دسته بندی جدایه های مختلف *سودوموناس آئروژینوسا* می باشد. از طرفی تکنیک های مورد استفاده در این مطالعه یعنی روش های RAPD-PCR، ERIC-PCR, Rep-PCR هر کدام ابزارهایی قدرتمند در دسته بندی *سودوموناس آئروژینوسا* هستند. اما روش های پیشرفته تر مولکولی مانند PFGE و MLST به منظور ژنوتایپینگ این باکتری توصیه می گردد. با توجه به این که منبع جداسازی جدایه ها با یکدیگر متفاوت است، بنابراین برقراری ارتباط آماری بین الگوهای باندی ایجاد شده در هر تکنیک مقدور نمی باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و پرسنل محترم بیمارستان های مورد مطالعه به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Wolska K, Kot B. Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. Acta Microbiol Immunol Hung. 2013; 60(3): 313-328.
2. Ahmadi K, Hashemian AM, Bolvardi E, Khadem Hosseini P. Vancomycin-resistant *Pseudomonas aeroginosa* in the cases of trauma. Med Arch. 2016; 70(1): 57-60.
3. El-Bialy AA, El-Shennawy GA, Mosaad AA, Bendary LA. Phenotyping and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* urine Isolates in Zagazig University Hospitals. Egyp J Med Microbiol. 2008; 17(4): 615-626.
4. 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; 1: 49-58.
5. Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Kusters K, Toelstra A, Verhoef J, Schmitz FJ. Molecular surveillance of European quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. using automated ribotyping. J Clin Microbiol. 2000; 38(10): 3636-3645.
6. Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhie JH. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in anintensive care unit. J Clin Microbiol. 1999; 37(11): 3654-3661.

www.SID.ir

Archive of SID

7. 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): 512-530.

8. 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): 269-274.

9. Tang YW, Stratton CW. Advanced techniques in diagnostic microbiology. 2th edition, Springer US, New York, 2013; pp: 91-246.

10. Stehling EG, Leite DS, Silveira WD. Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. Braz J Infect Dis. 2010; 14(5): 462-467.

11. 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. Iran J Med Sci. 2010; 35(3): 236-241.

12. Wolska K, Kot B, Jakubczak A, Rymuza K. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Folia Histochem Cytobiol. 2011; 49(4): 734-738.

13. 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(1): 274-282.

14. Strateva T. 2008. Microbiological and molecular-genetic investigations on the resistance mechanisms and virulence factors in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. MS.c. thesis. Medical University of Sofia, Bulgaria.

15. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients withcystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1996; 34(5): 1129-1135.

16. Wolska K, Szweda P. A comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Pol J Microbiol. 2008; 57(2): 157-163.

17. Hassan KI, Rafik SA, Mussum K. Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Kurdistan region. J Adv Med Res. 2012; 2(3): 90-98.

18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 7th edition, Saunders, Washington. 2012; 425-432.

19. Tsukayama DT, van Loon HJ, Cartwright C, Chmielewski B, Fluit AC, van der Werken C, Verhoef J. RADAR trial. The evolution of *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic rotation in a medical intensive care unit: theRADAR-trial. Int J Antimicrob Agents. 2004; 24(4): 339-345.

20. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrock-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K,

www.SID.ir

Archive of SID

Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000; 406(6799): 959-964.

21. Wiegand I, Marr AK, Breidenstein EB, Schurek KN, Taylor P, Hancock RE. Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(10): 3810-3813.

22. O'Carroll MR, Bell SC, Coulter C, Wainwright CE, Nissen M, Sloots T, Syrmis M. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* using repetitive element based PCR assays. In: Thompson PJ, Respirology. TSANZ 2003 Annual Scientific Meeting, Adelaide, Australia, (A47). 4-9 April, 2003.

23. Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, Nissen MD. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harbored by adult and pediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. J Med Microbiol. 2004; 53(11): 1089-1096.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 2, June 2016

Original Article

Genotyping of *Pseudomonas aeroginusa* isolated from hospital infections

Gholamreza Banisharif[1], Hassan Momtaz[2]

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

Abstract

Background & Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is a common opportunist pathogen in hospitals and the etiologic agent of the majority of infections in human beings. This study aimed to genotyping of *P. aeruginosa* isolated from hospital infections.

Materials & Methods: This cross-sectional study was performed on 18 isolates of *P. aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Shahrekord hospitals. We applied three different methods, RAPD-PCR, Rep-PCR and ERIC-PCR for genotyping of the isolates.

Results: Based on RAPD-PCR method, overall 86 different bands of DNA with a range of 300 to 1000 bps were obtained from the under study isolates and among them, 74 bands were polymorphic. Analysis of *P. aeruginosa* isolates based on ERIC-PCR produced 98 bands with a range of 150-8000 bps. Overall 16 genomic profile with 30 to 86% and for a few strains, 100% similarities were produced based on Rep-PCR.

Conclusion: Overall, all isolates showed polymorphic band patterns and no monochromic band was observed for the isolates. The presence of polymorphic band patterns in these techniques shows high rates of polymorphism in the genome of *P. aeruginosa*. Furthermore, the techniques used in this study are reliable approaches for genotyping of *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Hospital infections, RAPD-PCR, ERIC-PCR, Rep-PCR.

Correspondence to: Hassan Momtaz

Tel: +98 3833361045

E-mail: drhasanmomtaz@gmail.com

Journal of Microbial World 2016, 9(2): 96-107.

www.SID.ir