



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

عزیز ژاپونی<sup>۱</sup>، مجتبی انوری‌نژاد<sup>۱\*</sup>، جلال مردانه<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

<sup>۲</sup> گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

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

### چکیده

مقدمه: پسودوموناس آئروژینوزا از عوامل اصلی ایجاد کننده 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 Photo Capt و NTSYS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: بر اساس درصد تشابه ۵۰ درصد و ۶۴/۷ درصد و ۶۷/۵ درصد بدست آمده به وسیله دندروگرام، ۳۸ الگوی پلاسمیدی تشخیص داده شد که به ترتیب در خوشه‌های ۲، 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 در گیر می‌کنند. برای کنترل آلودگی زخم‌های بیمار با گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، باقیتی محیط حمام را پس از شستشوی محل سوختگی بیماران با مواد ضد عفونی کننده قوی گندزدایی کرد.

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

آنتریوبیوتیک‌های 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 کلام‌های آنتریوبیوتیکی مقاوم هستند، دارای الگوی فنوتیپی مشابهی بوده و پروفایل مقاومت آنتریوبیوتیکی در آن‌ها بسیار مشابه است (۱۱).

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 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 متغیر 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. به علاوه قدرت افتراق هر دو روش تایپ‌بندی برای مطالعات اپیدمیولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

## 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 و میر در این بیماران می‌شود (۱ و ۲).

بیماران سوختگی که با پسودوموناس کلونیزه شده‌اند را می‌توان به عنوان 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، ریبوتاپینگ، تجزیه و آنالیز به وسیله آنزیم‌های محدود کننده و روش پالس فیلد ژل الکتروفورز (PFGE) 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 موافقیت‌آمیزی در جداسازی میکروارگانیسم‌های مهم پژوهشی مثل پسودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰ و ۱۱). گاد (Gad) و همکاران به مطالعات فنوتیپی و ژنوتیپی بر روی ایزوله‌های محیطی و بالینی پرداخته‌اند و در نتایج آن‌ها سویه‌های محیطی مقاومت بالاتری را نسبت به

در دمای ۳۷ سانتی گراد انکوبه شد. سپس سلول‌ها توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند. در مرحله بعد سلول‌های تنه‌شین شده در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر شستشو داده شدند. DNA پلاسمیدی بر اساس روش Birnboim و Doly لیز قلیابی که استخراج شدند (۱۲). سپس با حرارت دادن ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و با پروتئیناز K هضم، و به وسیله فلن 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 -EDTA -Tris در صد آگاروز از هم جدا و در بافر 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 به وسیله آب مقطر انجام گردید. ژل را برای بررسی و عکس‌برداری در United States Of America gel scan دستگاه Kodak Gel Logic 200 (Gel) 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) به وسیله ایندکس سیمپسون (SID) مشخص شد (۱۳). تعیین شباهت در بین ایزوله‌ها با کمک نرم‌افزار NTSYS ویرایش K ۲/۰۲ و ترسیم دندروگرام انجام گرفت.

#### مواد و روش‌ها

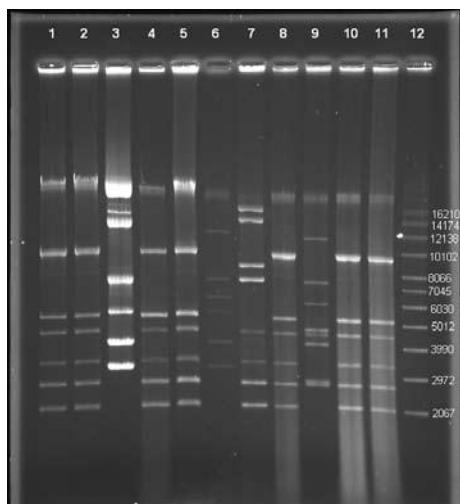
در این مطالعه ۶۳ سویه پسودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بیمارستان سوختگی قطب‌الدین شیراز و ۱۱ سویه از محیط این بیمارستان جدا شدند. نمونه‌گیری از افراد پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آنها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه صورت پذیرفت. نمونه‌گیری با استفاده از سواب استریل 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 بlad آگار، شکلات آگار و مک‌کانکی آگار (ساخت شرکت Oxoid) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند سپس از کلونی‌های مشکوک مجدداً ساب كالچر انجام و کلونی خالص از ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا به دست آورده شد. تشخیص نهایی ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های میکروبیولوژی شامل خصوصیات مورفو‌لژیک 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 برات (TSB) (ساخت شرکت Oxoid) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد 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

### یافته‌ها

در این مطالعه ۳۸ الگوی مختلف پلاسمید از ۹-۶ باند جدا شده توسط برنامه کامپیوتري Photo Capt با شاخص افتراق قابل قبول ( $DI=0.93$ ) 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 او ۲ 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) خوشبندی 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 ۲/۷ تا ۳/۷ bp

### شرایط تعیین AP-PCR

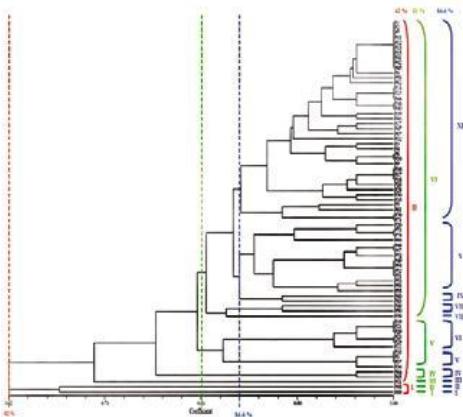
در یک حجم ۵۰ میکرولیتری مواد زیر اضافه گردید: ۰/۵ میلی مolar پرایمر (۵<sup>۰</sup>-AGG<sup>۵</sup>-GGT), BIOL Syntheselabor TIB (<sup>۳</sup>CTT dNTPs GmbH برلين، آلمان)، ۲۰۰ میکرو مolar ۲/۵ میلی مolar MgCl<sub>2</sub>، ۲/۵ واحد پلیمراز Taq (سینا ژن، ايران) و ۵ میکرولیتر DNA تکثیر (DNA برای ۴۵ دوره به شرح زیر انجام شد: دناتوراسیون DNA در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال DNA به پرایمر در ۳۷ درجه به مدت ۳ دقیقه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. بعد از ذخیره عکس‌ها به کمک برنامه کامپیوتري به نام Lithuania (۱۰۰ bp مارکر مقایسه با مارکر مخصوص 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 (UPGMA) analysis سپس برای مطالعه الگوی تغییرات مشاهده شده در میان ایزوله‌ها نتایج قبلی در کنار یکدیگر بررسی شدند و در آخر نرم‌افزار کامپیوتري NTSYS-PC مورد استفاده قرار گرفت تا نتیجه نهایی به دست آمد.

### تیپ‌بندی به روش AP-PCR

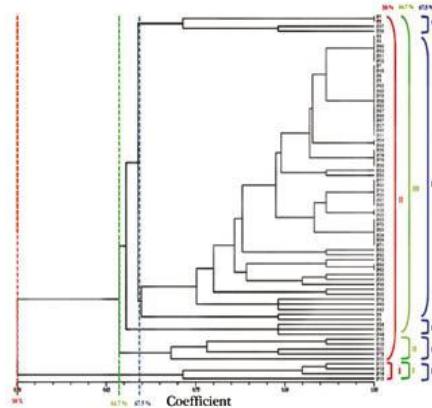
آنالیز و تجزیه و تحلیل محصولات این روش مشابه روش تیپ‌بندی پلاسمیدی انجام گردید و دندروگرام مربوطه رسم شد.

متغیر بود و در مجموع ۴۷ الگوی متفاوت بدست آمد

(شکل ۳).



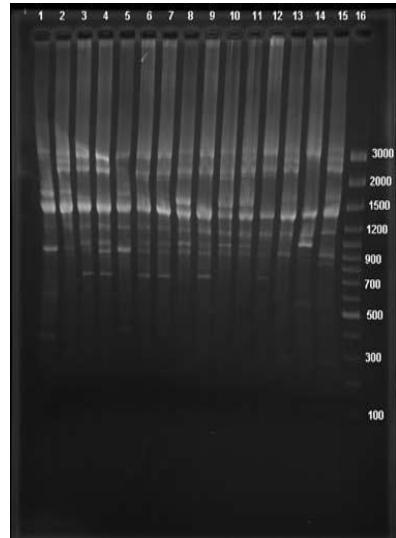
شکل ۴) دندروگرام AP-PCR. ۷۴ ایزوله پسودوموناس آثروژینوزا. بر اساس درصد تشابه ۶۲ درصد، درصد ۸۱ درصد و ۸۴/۶ به ترتیب ۲، ۵ و ۱۱ خوش به دست آمد. شماره های لاتین نشان دهنده خوش ها با شباهت های متفاوت است.



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 خوش به دست آمد. شماره های لاتین نشان دهنده خوش ها با شباهت های متفاوت است.

## بحث

در این مطالعه نتایج آنالیز پروفایل ژنتیکی حاصل از آنالیز سویه های جداد شده از نمونه های بالینی و محیط بیمارستان نشان می دهد که سویه های بالینی و سویه های جدا شده از محیط بیمارستان با هم همخوانی ژنتیکی داشته و احتمالاً از این Source می باشند. به طور کلی در بررسی های اپیدمیولوژیک و نیز در طغيان عفونت های باكتريائي به منظور یافتن منشاء آلودگی و نیز راه های انتقال آن از تكينيك های مختلف تايپينگ (از جمله فنوتاپينگ و ژنوتاپينگ) استفاده می گردد. از آنجايي که خصوصيات فنوتيبي نظير الگوهای بيوشييميايی، تعين تipe فاز، آنتي زن های سطحي سلول و الگوی حساسيت آنتي بيوتيكي تحت شرایط مختلف فاز رشد و جهش خود به خودی تمایل زیادي به تغيير دارند (۱۴-۱۶). بنابراین ضروري است در کنار روش های فنوتيبي از تكينيك های ژنوتيبي نيز استفاده کرد. امروزه روش های ژنوتيبي با قدرت افتراق بالا برای ارتباط بين سوش های داخل يك گونه و كلوناليتي و بررسی



شکل ۳) الگوی به دست آمده از ۱۵ ایزوله پسودوموناس آثروژینوزا به کمک روش AP-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 اين معيارهای به ترتیب به ۲ گروه (I&II) و ۵ گروه (III, IV&V, I) و IV, V, VI, VII, VIII, IX, X&XI ۱۱ گروه (I, II, III) خوش بهندی شدند (شکل ۴).

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 insertion, point mutation و ya deletion با 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 ژنتوتایپ غالب مستول طغیان‌های جاری ناشی از ارگانیسم بوده و این دو سویه در واقع مستول 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 می‌باشد (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 جدا شده از محیط بیمارستان به احتمال فراوان از یک کلون میکروبی هستند و بیماران با سویه‌های ساکن در محیط بیمارستان کلونیزه می‌شوند. این سویه‌ها به دلیل دارا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و به ویژه مقاومت به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در درمان بیماران از جمله کاریاپن‌ها که به عنوان آخرین خطوط درمانی در

اپیدمیولوژی سویه‌های یک گونه باکتریایی به کار می‌رود (۱۷-۱۹). 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  $DI=0/93$  ایزوله‌های جداشده را به ۳، ۲ و ۵ گروه و به ترتیب با سطح تشابه ۵۰ درصد،  $64/7$  درصد و  $67/5$  درصد خوشبندی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ایزوله‌های با  $DI$  بالاتر از  $0/97$  و سطح تشابه  $(62/5)$  درصد،  $81$  درصد و  $84$  درصد را به ۳ گروه ۲، ۵ و ۱۱ خوشبندی کرد. پیشنهاد شده است روش تایپ‌بندی با  $DI$  بیشتر از  $0/9$  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 PCR AP-PCR قدرت تکرارپذیری بیشتری در مقایسه با تجزیه و تحلیل پروفایل پلاسمید می‌باشد. با این حال، تغییر در درجه حرارت مرحله اتصال (annealing)، غلظت  $MgCl_2$ , dNTPs 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 می‌گردد و احتمالاً بین بیماران و بخش‌های مختلف منتقل می‌گردد. اگرچه برخی از ایزوله‌ها در گروه‌های

### 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 آلدگی بیماران همان سویه‌هایی هستند که در بیمارستان کلونیزه شده‌اند و بیماران سوختگی را آلدہ می‌کنند. نتایج حاصل از این جنبه دارای اهمیت فراوان است که جهت جلوگیری از عفونی شدن بیماران با این سویه‌ها که معمولاً مقاومت چندداروبی دارند ضروری است که پروتکل‌های ضد عفونی بخش‌های مختلف بیمارستان مورد بازنگری مجدد قرار گیرند و طوری طراحی شوند که به ریشه‌کنی این سویه‌ها از محیط بیمارستان سوختگی متنه‌گردد. در نهایت رعایت همه این موازین منجر به آن خواهد شد که میزان مرگ و میر در بیماران سوختگی و نیز هزینه‌های درمانی آنان کاهش یابد. اغلب آزمایشگاه‌های بالینی در ایران امکانات انجام مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی را نداشتند و این امکانات تنها محدود به آزمایشگاه مرجع می‌باشد. 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.

درمان عفونت‌ها استفاده می‌شوند درمان این بیماران را با مشکل مواجه کرده و با مرگ و میر بالایی در این بیماران همراه است. منابع بیمارستانی و نیز محیط بیمارستان می‌توانند به عنوان منبعی برای این ارگانیسم پاتوژن عمل نمایند و سبب آلدگی 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 آلدگی منابع دیگری نظیر مواد غذایی که ممکن است ارگانیسم‌های مختلف از این مسیر وارد محیط‌های بیمارستانی شده و بیماران را آلدہ نمایند و نیز بررسی پروفایل آنتی‌بیوتیکی و نیز بررسی قرابیت 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.

### References:

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

- 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. Birnboim H, Doly JA. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic 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 marcescens* 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*

- 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. coli* 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.

Original Article

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

A. Japoni<sup>1</sup>, M. Anvarinejad<sup>1\*</sup>, J. Mardaneh<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> 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, 3 and 5 clusters, based on 50%, 64.7% and 67.5% similarity on the plotted dendrogram, respectively. Drawn dendrogram 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.