Survey and typing of Pseudomonas aeruginosa strains causing nosocomial infection using multiple-locus variable number tandem repeat analysis

Samaneh Rouhi[1, 2], Parviz Mohajeri[3], Rashid Ramazanzadeh[4, 5]

1. PhD of Molecular Epidemiology of Bacteria, Lung Diseases and Allergy Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
2. PhD of Molecular Epidemiology of Bacteria, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
3. Associate Professor of Medical Bacteriology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
4. Professor of Medical Bacteriology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. 5. Professor of Medical Bacteriology, Microbiology Department, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, , Tel: +98 87-3323441, atrop_t51@yahoo.com

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

ABSTRACT

Background and Aim: Identification of the source of Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) as cause of nosocomial infections is an important step towards infection control. The purpose of this study was to perform multiple-locus variable number tandem repeat survey and analysis for typing of *P. aeruginosa* as a cause of nosocomial infection.

Material and Methods: This descriptive-analytic study included 134 clinical samples of *P. aeruginosa* in Sanandaj from December 2015 to August 2017. Phenotypic tests and PCR were performed to confirm *P. aeruginosa*. Molecular typing was carried out by variable number of tandem repeats (VNTR), and analysis was performed using a zero-and-one matrix. Using Stata 12, data were analyzed by chi-square and Fisher's exact tests ($p \leq 0.05$).

Results: 41.79% of *P. aeruginosa* strains were associated with nosocomial infections. The highest number of clinical specimens were related to tracheal (51.78%) and the least number associated with sputum and abdominal fluid (each one1.78%). There was a significant relationship between nosocomial infections and intensive care unit (ICU) ($p \leq 0.05$). Also nosocomial infections showed a significant relationship with tracheal samples ($p \leq 0.05$). Analysis of 10 strains isolated from nosocomial infections showed 10 patterns with a similarity of 72%.

Conclusion: Nosocomial infections were related to *P. aeruginosa* and we showed epidemiological distributions of this bacterium in our study. Identification of the origin of the bacteria responsible for nosocomial infections is an important step in the prevention and control of these infections.

Keywords: Multiple-locus variable number tandem repeat, *Pseudomonas aeruginosa*, Nosocomial infections

Received: Sep 01, 2018 **Accepted:** Dec 08, 2018

How to cite the article:
Rouhi S, Mohajeri P, Ramazanzadeh R. **Survey and typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing nosocomial infection using multiple-locus variable number tandem repeat analysis.** SJKU 2018; 23 (6): 128-141.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بررسی و تیپ بندی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای عامل عفونت بیمارستانی توسط تجزیه و تحلیل تعداد توالی های متغیر تکراری پشت سر هم چند لوکوسی

سمانه روحی[۱،۲]، پرویز مهاجری[۳]، رشید رمضانزاده[۴،۵]

۱. دکترای اپیدمیولوژی مولکولی باکتری ها، مرکز تحقیقات بیماریهای ریه و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۲. دکترای اپیدمیولوژی مولکولی باکتری ها، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۳. دانشیار باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۴. استاد باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۵. استاد باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (نویسنده مسئول) تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۳۲۳۲۴۴۱، atrop_t51@yahoo.com

چکیده

مقدمه: شناسایی منبع پسودوموناس آئروژینوزای عامل عفونت بیمارستانی عامل مهم در کنترل عفونت است. هدف از این مطالعه بررسی و تجزیه‌وتحلیل تعداد توالی‌های متغیر تکراری پشت سرهم چند لوکوسی جهت تیپ بندی سویه های پسودوموناس آئروژینوزای عامل عفونت بیمارستانی است.

روش کار: مطالعه توصیفی-تحلیلی حاضر طی آذر ۱۳۹۴ الی اسفند ۱۳۹۶ در شهر سنندج روی ۱۳۴ نمونه بالینی پسودوموناس آئروژینوزا انجام شد. آزمایش های فنوتیپی میکروب شناسی و PCR جهت تائید پسودوموناس آئروژینوزا انجام شد. تیپ بندی مولکولی به روش توالی های متغیر تکراری پشت سرهم چند لوکوس انجام و تجزیه و تحلیل آن با استفاده از رسم ماتریکس صفر و یک صورت گرفت. جهت تحلیل داده ها از نسخه ۱۲ Stata و آزمون دقیق فیشر و مجذور کای استفاده شد ($p\leq ۰/۰۵$).

یافته‌ها: درصد سویه های پسودوموناس آئروژینوزا که مرتبط با عفونت بیمارستانی بودند ۴۱/۷۹٪ بود. بیشترین نمونه های بالینی عفونت بیمارستانی مرتبط با تراکئال (۵۱/۷۸٪) و کمترین مربوط به خلط و مایع شکمی (هرکدام ۱/۷۸٪) بود. بین عفونت بیمارستانی و بخش مراقبت ویژه و همچنین با نمونه های تراکئال ارتباط معنی داری مشاهده شد ($p\leq ۰/۰۵$). آنالیز ۱۰ سویه جداشده از عفونت بیمارستانی وجود ۱۰ الگو با تشابه ۷۲٪ را نشان داد.

نتیجه‌گیری: عفونت‌های بیمارستانی مرتبط با پسودوموناس آئروژینوزا و پراکنش اپیدمیولوژیکی این باکتری در مطالعه ما نشان داده شد. بررسی منشأ باکتری‌های علت عفونت بیمارستانی گام مهم در پیشگیری و کنترل آن است.

کلمات کلیدی: توالی‌های متغیر تکراری پشت سرهم چند لوکوسی، پسودوموناس آئروژینوزا، عفونت بیمارستانی

وصول مقاله: ۹۷/۶/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۹/۷ پذیرش: ۹۷/۹/۱۷

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

مقدمه

معمولاً عفونت‌هایی که بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از بستری شدن بیمار در بیمارستان ظاهر می شوند را به عنوان عفونت های بیمارستانی قلمداد می‌کنند. انتروباکتریاسه ها از دسته باکتری‌های گرم منفی و یکی از شایع ترین عوامل ایجادکننده عفونت بیمارستانی می‌باشند (۲ ،۱). در این میان باکتری پسودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی و بیماری زای فرصت طلب است و اصولاً در بیماران بستری، بیماران دارای کاتاتر و بیماران دچار نقص سیستم ایمنی مثل نوتروپنی، بیماران دچار سوختگی و سیستیک فیبروزیس ایجاد بیماری می‌کند (۳). پاک‌سازی پسودوموناس‌ها از بیماران اغلب به علت ضعف ایمنی بیماران مبتلا به عفونت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها دشوار است (۴). ژن‌های مقاومت در این باکتری ها بهروش‌های متعدد انتقال و از یک باکتری به باکتری دیگر منتشر می‌شوند. این انتقال نقش اساسی در انتشار و اپیدمی مقاومت ضدمیکروبی دارد. بنابراین بررسی انتشار و وابستگی بین سویه های جدا شده از بیماران و ارتباط فیلوژنتیکی آن ها با استفاده از روش های مولکولی جهت بررسی ابعاد اپیدمیولوژیک بیماری‌ها با اهمیت است (۵). از جمله این روش ها می‌توان به تعیین تعداد توالی‌های متغیر تکراری پشت سر هم Variable number tandem repeat (VNTR) اشاره کرد. هم اکنون روش VNTR از روش های رایج در جداسازی و شناسایی سویه باکتری ها است و برای تایپینگ باکتری ها از نظر اپیدمیولوژیک به کار می رود (۶). در تکنیک تجزیه و تحلیل لوکوس های چند گانه یا توالی های متغیر تکراری پشت سر هم، ابتدا انتخاب لوکوس های مورد نظر انجام می‌شود. سپس تکثیر توالی‌های حاوی VNTR به روش PCR انجام و نهایتاً آنالیز و تجزیه‌وتحلیل آن Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) صورت می‌پذیرد. درنهایت محصول به دست آمده از PCR تعیین توالی شده و تعداد تکرار محاسبه می‌گردد (۸ ،۷). محققان مختلف به‌وسیله روش MLVA به تیپ بندی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا پرداخته‌اند:

Turton و همکاران در انگلستان در ۲۰۱۰ تحقیقی را با استفاده از ۹ لوکوس ژنی به‌وسیله روش های MLVA و ژل الکتروفورز در میدان الکتریکی ضربان دار Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) انجام دادند و ۷۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا را در ۳۸ الگوی مختلف ژنومی طبقه‌بندی کردند (۹). Onteniente و همکاران در سال ۲۰۱۰ در فرانسه با استفاده از هشت لوکوس و به روش MLVA، ۸۹ سویه پسودوموناس آئروژینوزا را به ۷۱ الگوی ژنومی تقسیم کردند (۷). در مطالعه‌ای دیگر، Johansson و همکاران در سوئد در سال ۲۰۱۵ به روش MLVA به‌وسیله ۱۱ لوکوس، ۲۳۲ سویه پسودوموناس آئروژینوزا را در ۷۸ تیپ دسته بندی نمودند (۸).

عفونت بیمارستانی یکی از مهم‌ترین مشکلات در بیمارستان‌ها بشمار می‌آید. از طرفی در صورتی که روی بیماری‌های عفونی کنترل اپیدمیولوژیکی صورت نگیرد هزینه درمان و مرگ میر افزایش خواهد یافت. به‌وسیله روش‌های درمانی بالینی و بررسی و کنترل‌های اپیدمیولوژیک به‌صورت هم‌زمان یک بیماری به‌طور کامل ریشه کن خواهد شد. همچنین انجام هریک از اقدامات نامبرده به تنهایی ناکافی است؛ بنابراین شناسایی منبع عفونت و تشخیص سویه های میکروبی مولد این نوع عفونت مهم و قابل توجه است. در این رابطه نقش و اهمیت پسودوموناس آئروژینوزا با عفونت های بیمارستانی ثابت شده است. همان‌طور که گفته شد، ژنوم این باکتری غنی از توالی های تکراری است و این توالی ها ابزار مناسبی جهت تیپ بندی اپیدمیولوژیکی این باکتری است که از بیماران و یا از مکان‌های مختلفی جدا شده اند. تیپ بندی اپیدمیولوژیکی این باکتری می تواند اطلاعات بسیار مفید و مؤثری را در مورد منشأ عفونت در اختیار پزشکان و کادر درمانی بگذارد که به‌وسیله آن درمان، کنترل و پیشگیری از عفونت‌های حاصل از این باکتری را تسهیل می‌کند. با توجه به

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

جستجوهای متنوع و کامل در منابع، مطالعه‌ای کامل و جامع بر روی جداسازی، شناسایی و بررسی اپیدمیولوژی مولکولی پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های بیمارستانی از بیمارستان های استان کردستان یافت نشد؛ بنابراین با توجه به موارد ذکر شده مطالعه و تحقیق در مورد این باکتری ضروری به نظر می رسد. هدف از این مطالعه، بررسی و تعیین رابطه ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای ایجاد کننده عفونت بیمارستانی به منظور ردیابی و ارزیابی سویه های منتشر در بیمارستان با استفاده از روش MLVAاست.

روش کار

نوع مطالعه

مطالعه مقطعی و توصیفی-تحلیلی حاضر طی آذر ۱۳۹۴ الی اسفند ۱۳۹۶ در شهر سنندج، گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی در دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شد. تشخیص فرد مبتلا به عفونت بیمارستانی با توجه به معیارهای ملی سیستم نظارت بر عفونت های بیمارستانی National nosocomial infections surveillance (NNIS)، مراکز مدیریت و پیشگیری بیماری Centers for Disease Control and Prevention (CDC) و همچنین پرستاران کنترل عفونت در بیمارستان های تحت پوشش مطالعه انجام شد (۱۰،۱۱). جامعه آماری شامل تمامی افراد مبتلا به عفونت‌های بیمارستانی در بیمارستان‌های آموزشی تابع دانشگاه علوم پزشکی کردستان بودند. معیار ورود شامل تمامی بیماران مبتلا به عفونت بیمارستانی بود که نمونه های بالینی آن ها به‌وسیله باکتری پسودوموناس آئروژینوزا عفونی شده بودند.

جمع آوری نمونه

تعیین حجم نمونه به‌صورت سرشماری از بیمارستان‌های آموزشی استان کردستان انجام شد. نمونه‌های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا (شامل: خون، ادرار، مدفوع، نمونه مجاری تنفسی و ... بودند) از ۴۵۰۲ بیماران مشکوک به عفونت بیمارستانی (عفونت‌های خونی، مجاری تنفسی و ادراری) مراجعه کننده به بخش های مختلف بیمارستان ها در شهرهای مختلف جمع‌آوری شدند (کد اخلاقی: MUK.REC. 1394/337).

تشخیص و تائید باکتری پسودوموناس آئروژینوزا به روش فنوتیپی

جهت شناسایی فنوتیپی خانواده سودوموناس آزمایش های میکروب شناسی شامل رنگ آمیزی گرم (این باکتری به‌صورت باسیل های کوچک گرم منفی به نظر می‌رسد)، کشت بر روی محیط عمومی بلاد آگار و انتخابی مک کانکی آگار (با توجه به اینکه این باکتری غیر تخمیری است روی این محیط به‌صورت کلنی های بی رنگ دیده می شود) (مرک، آلمان)، آزمایش اکسیداز و کاتالاز (این باکتری اکسیداز و کاتالاز مثبت است) (پادتن طب، ایران) انجام شد. آزمایش سولفید (تولید سولفید این باکتری منفی است)، ایندول (پسودوموناس آئروژینوزا تست ایندول منفی دارد)، حرکت در محیط سولفید ایندول موتیلیتی (این باکتری متحرک و دارای فلاژل است)، متیل رد و وگس پرسکوئر (پسودوموناس آئروژینوزا تست متیل-رد و وگس پرسکوئر منفی دارد) کشت در محیط سیترات (این باکتری قادر به استفاده از سیترات می باشد و تست آن مثبت است) (مرک، آلمان) و تریپل شوگر آیرون آگار (این باکتری غیر تخمیری است و محیط را بدون تولید گاز قرمز رنگ می‌کند) (مرک، آلمان) انجام شد. جهت جدا سازی گونه آئروژینوزا از سایر سودموناس ها تست های توانایی رشد در حرارت ۴۲ درجه سانتی‌گراد، تولید رنگ ریزه سبز، آبی و سایر رنگ ریزه‌ها روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) و تست تعیین متابولیسم تخمیری - اکسیداتیو (این باکتری هوازی است و در لوله بدون پوشش گلوگز را اکسید و محیط را زرد می‌کند) (مرک، آلمان) انجام شد (۱۲).

استخراج DNA

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

در ابتدا جهت استخراج DNA از نمونه هایی که در مرحله اول (به‌وسیله تست های فنوتیپی) به عنوان باکتری پسودوموناس آئروژینوزا مورد تائید قرار گرفته بودند کشت ۲۴ ساعته انجام شد. سپس سوسپانسیون باکتری در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر تهیه و به آن خورده شیشه اضافه شد. بعد از این مرحله سوسپانسیون باکتریایی به مدت یک دقیقه ورتکس و در ۷۰۰۰ دور برای ۵ دقیقه سانتریوفیوژ شد و ۲۰ میکرو لیتر مایع بالایی آن به عنوان DNA استفاده شد (زیرا مایع پایینی بیشتر شامل رسوب پروتئین است و تا حد امکان بهتر است از روی مایع که شفاف و شامل DNA است استفاده شود). جهت اطمینان از خلوص DNA و عدم وجود آلودگی‌های پروتئینی جذب نوری Optimum Density (OD) تمامی DNA های استخراج شده در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومترخوانده شد و تمام نمونه ها دارای OD بین ۲-۱/۸ بودند (OD ۲-۱/۸ مورد قبول است).

تشخیص و تائید باکتری پسودوموناس آئروژینوزا به روش PCR

روش PCR با استفاده از پرایمر های ژن ژیراز gyrase B یا*gyr*B به عنوان ژن Housekeeping جهت تائید سویه های پسودوموناس آئروژینوزا استفاده شد (سویه های کنترل مثبت پسودوموناس آئروژینوزا داری ژن *gyr*B از شرکت داروواش، ایران تهیه شد). حجم ۲۵ میکرولیتر ماده شامل ۱۲ میکرولیتر Master mix با غلظت 2X، ۸ میکرولیتر آب، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت Forward (F)– Primer (L: CCTGACCATCCGTCGCCACAAC) و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت Reverse (R) – Primer (R: CGCAGCAGGATGCCGACGCC) با سایز نهایی ۲۲۲ bp هر کدام با غلظت ۱۰ پیکومول و سپس ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر جهت انجام PCR آماده شد. واسرشتن اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشتن ثانویه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در ۶۶ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، طویل سازی اولیه ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (۳۵ سیکل) جهت انجام PCR ژن *gyr*B مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای *gyr*B با استفاده از مقاله Mulamattathil و همکاران تهیه شد (سیناکلون، ایران) (۱۳).

تیپ بندی مولکولی به روش MLVA

روش MLVA با استفاده از هشت لوکوس یا جایگاه ژنی جهت تیپ بندی ده سویه پسودوموناس آئروژینوزای عامل عفونت بیمارستانی بکار گرفته شد. با توجه به کمبود هزینه و صرفه جویی در وقت ده نمونه مورد بررسی قرار گرفتند. این ده نمونه به‌صورت نمونه‌گیری تصادفی انتخاب شدند و احتمال انتخاب تمام ده نمونه ممکن یکسان و برابر بود (سویه کنترل مثبت پسودوموناس آئروژینوزا PAO1 که دارای لوکوس های مورد نظر بودند در این تحقیق از دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران تهیه شد). همچنین مشخصات نمونه های جدا شده از بیماران جهت انجام روش MLVA در جدول بیان شده است (جدول ۱).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

جدول ۱- خصوصیات سویه‌های پسودموناس آئروژینوزا استفاده شده از بیماران دارای عفونت بیمارستانی در روش MLVA

شماره سویه های مورد بررسی	سن	جنس	شهر	بیمارستان	بخش	نوع نمونه
۵	۷۹	زن	سنندج	توحید	مراقبت های ویژه	تراکئال
۱۵	۲۶	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکئال
۱۷	۵۸	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکئال
۳۷	۳۶	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکئال
۳۹	۶۵	مرد	سنندج	بعثت	جراحی عمومی	مایع پلورال
۴۲	۲۷	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکئال
۴۵	۵۰	زن	سنندج	توحید	انکولوژی	ادرار
۴۹	۴۹	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکئال
۶۶	۴۳	مرد	سنندج	توحید	جراحی مردان	ادرار
۷۲	۲۴	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکئال

جهت انجام PCR در ابتدا ۲۵ میکرو لیتر ماده که شامل ۱۲ میکرو لیتر Master mix با غلظت 2X، ۸ میکرو لیتر آب، ۱ میکرو لیتر F- Primer و ۱ میکرو لیتر R- Primer هرکدام با غلظت ۱۰ پیکومول آماده و سپس ۳ میکرو لیتر از DNA استخراج شده با غلظت ۵۰ نانو گرم بر میکرو لیتر به آن اضافه شد. برای ژن ms194-5915 شرایط PCR به‌صورت زیر بود: واسرشتن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، واسرشتن ثانویه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، طویل سازی اولیه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و طویل سازی نهایی در ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه (۴۵ سیکل). همچنین برای ژنms173-5186 شرایط PCR به‌صورت زیر بود: واسرشتن اولیه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، واسرشتن ثانویه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در ۶۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، طویل سازی اولیه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و طویل سازی نهایی در ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه (۴۵ سیکل). برای سایر ژن‌ها نیز شرایط PCR به‌صورت زیر بود: واسرشتن اولیه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، واسرشتن ثانویه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، طویل سازی اولیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۹۰ ثانیه و طویل سازی نهایی در اولیه ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه (۳۰ سیکل). محصولات PCR کلیه ژن‌ها روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و با استفاده از پردازش با نور UV از جهت وجود باندهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت باندهای ایجاد شده بر روی ژل ها که نشان دهنده اندازه هرکدام از توالی ها بود با استفاده از مارکر ۱۰۰ الی ۳۰۰۰ bp (سیناکلون، ایران) مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

مورد نظر در این روش با استفاده از مقاله Onteniente و همکاران تهیه (سیناکلون، ایران) و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲) (۷).

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه به روش MLVA (اندازه محصول بر اساس محصولات حاصل از سویه‌های کنترل مثبت است)

نام لوکوس	ردیف های نوکلئوتیدی	اندازه محصول (base pairs; bp) PCR
ms010-0098	L: GCAGGAACGCTTGCAGCAGGT R: CTTCGCCGACCCAGGGATCA	۱۶۷
ms061-1844	L: CTTGCCGTGCTACCGATCC R: CCCCCATGCCAGTTGC	۱۲۷
ms077-2263	L: GCGTCATGGTCTGCATGTC R: TATACCCTCTTCGCCCAGTC	۴۴۲
ms127-3496	L: CTCGGAGTCTCTGCCAACTC R: GGCAGGACAGGATCTCGAC	۲۱۰
ms142-3873	L: AGCAGTGCCAGTTGATGTTG R: GTGGGGCGAAGGAGTGAG	۸۹۰
ms172-5083	L: GGATTCTCTCGCACGAGGT R: TACGTGACCTGACGTTGGTG	۷۸۹
ms173-5186	L: CTGCAGTTCGCGCAAGTC R: ATTTCAGCCAGCGTTACCAA	۳۵۰۳
ms194-5915	L: CCTTAGGAGGCGCTGGTC R: AGCTGCTGGCAAGGCTCT	۶۹۰

تجزیه و تحلیل داده ها

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون دقیق فیشر (Fisher Exact Test) و مجذور کای (Chi-squared test) انجام شد (p≤۰/۰۵). جهت بررسی فراوانی و برای بررسی اثر متغیرهای مستقل در حضور یکدیگر از مدل رگرسیون لوجستیک استفاده شد (p≤۰/۰۵). در تجزیه و تحلیل روش VNTR یا MLVA، باندهای حاصل از واکنش به‌وسیله نرم افزار آنلاین http://genomes.urv.es/UPGMA/ با استفاده از ماتریکس صفر و یک حاصل از وجود یا عدم وجود باند های مورد نظر آنالیز شد (Tolerance 1.5-2 , Dicesimilarity coefficients (DSC) 95%) . در انتها تعداد تکرار برای هر لوکوس در هر نمونه نیز با استفاده از مشخصات لوکوس در مقاله Onteniente و همکاران و فرمول زیر در سایت http://www.applied-maths.com/bionumerics-server محاسبه شد (جدول ۳) (۱۴ ، ۷).

$$Copy\,number = \frac{Amplicon\ size - Offset\ size}{Repeat\ size}$$

یافته ها

در این مطالعه ۱۴۶ ایزوله از خانواده پسودوموناس جمع‌آوری و ۱۳۴ ایزوله از آن‌ها به عنوان پسودوموناس آئروژینوزا در روش PCR شناسایی شدند (در روش فنوتیپی ۱۳۳ شناسایی شدند و با توجه به اینکه روش PCR دقیق تر است روی ۱۳۴ سویه آزمایش‌های انجام شد). دراین‌بین، ۵۶ (۴۱/۷۹٪) ایزوله مرتبط با عفونت بیمارستانی بودند و از بیمارستان مختلف آموزشی در شهرهای استان جداسازی شدند (جدول ۴).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

جدول ۴- فراوانی عفونت بیمارستانی مرتبط با پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از شهر ها و بیمارستان های استان کردستان

شهر	بیمارستان	عفونت بیمارستانی (٪)
سنندج	توحید	۳۱ (٪۳۵/۵۵)
سنندج	بعثت	۲۴ (٪۸۵/۴۲)
مریوان	فجر	۱ (٪۱/۷۸)
سقز	امام خمینی (ره)	-
بیجار	امام حسین (ع)	-
کل	۵	۵۶

در این مطالعه بیشترین نمونه‌های عفونت بیمارستانی از بخش مراقبت های ویژه جدا شدند و بیشترین نمونه های بالینی مرتبط با عفونت بیمارستانی که از آن باکتری پسودوموناس آئروژینوزا جدا شد، مربوط به نمونه تراکئال بود (جدول ۵).

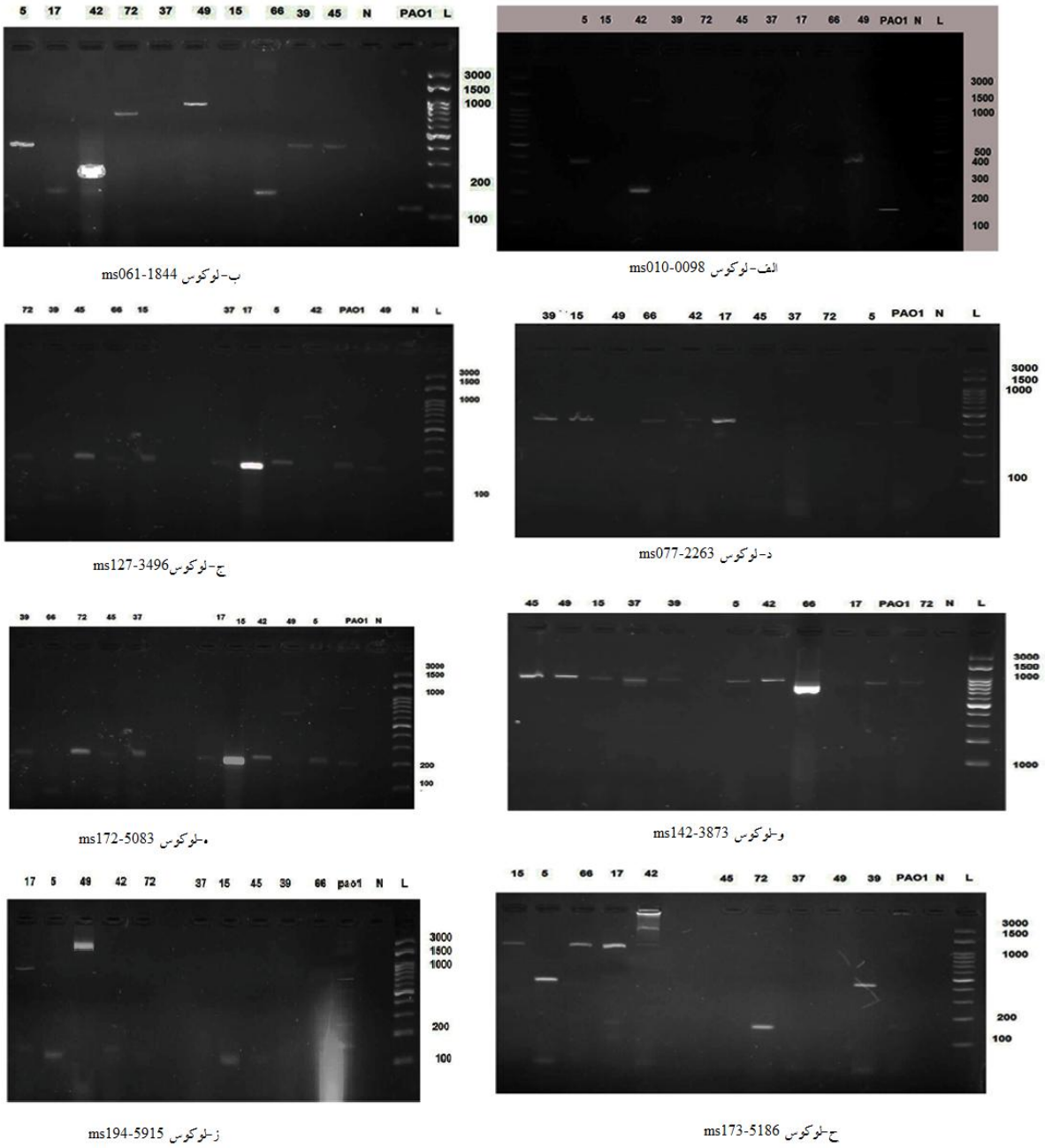
جدول ۵- فراوانی عفونت بیمارستانی مرتبط با پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بخش‌ها و نمونه های مختلف

بخش	عفونت بیمارستانی مرتبط با بخش ها (٪)
مراقبت های ویژه	۳۹ (٪۶۹/۶۴)
نورولوژی	۶ (٪۴/۴۷)
جراحی مردان	۴ (٪۲/۹۸)
سوختگی	۲ (٪۱/۴۹)
اورژانس	۱ (٪۱/۷۸)
داخلی مردان	۱ (٪۱/۷۸)
قلب زنان	۱ (٪۱/۷۸)
انکولوژی	۱ (٪۱/۷۸)
جراحی عمومی	۱ (٪۱/۷۸)
کل	۵۶ (٪۴۱/۷۹)
نمونه	**عفونت بیمارستانی مرتبط با نمونه ها (٪)**
تراکئال	۲۹ (٪۵۱/۷۸)
ادرار	۱۲ (٪۲۱/۴۲)
زخم	۵ (٪۸/۹۲)
خون	۳ (٪۵/۳۵)
ترشحات ریه	۳ (٪۵/۳۵)
مایع پلورال	۲ (٪۳/۵۷)
خلط	۱ (٪۱/۷۸)
مایع شکمی	۱ (٪۱/۷۸)
کل	۵۶ (٪۴۱/۷۹)

بین عفونت بیمارستانی و بخش‌ها و نمونه‌های مختلف بیمارستانی ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p \leq ۰/۰۵$). در روش MLVA پس از تکثیر ژن‌ها توسط PCR برای محصول به دست آمده از توالی های هر ۸ ژن، الکتروفورز

بر روی ژل آگاروز صورت گرفت. شکل یک محصولات PCR الکتروفورز شده از هرکدام از ژن ها را نشان می دهد (شکل ۱).

شکل ۱- الگوی مولکولی لوکوس های پسودوموناس آئروژینوزا روی ژل به روش MLVA (L: لدر ۱۰۰-۳۰۰۰ bp، کنترل منفی: N، کنترل مثبت: پسودوموناس آئروژینوزا PAO1)

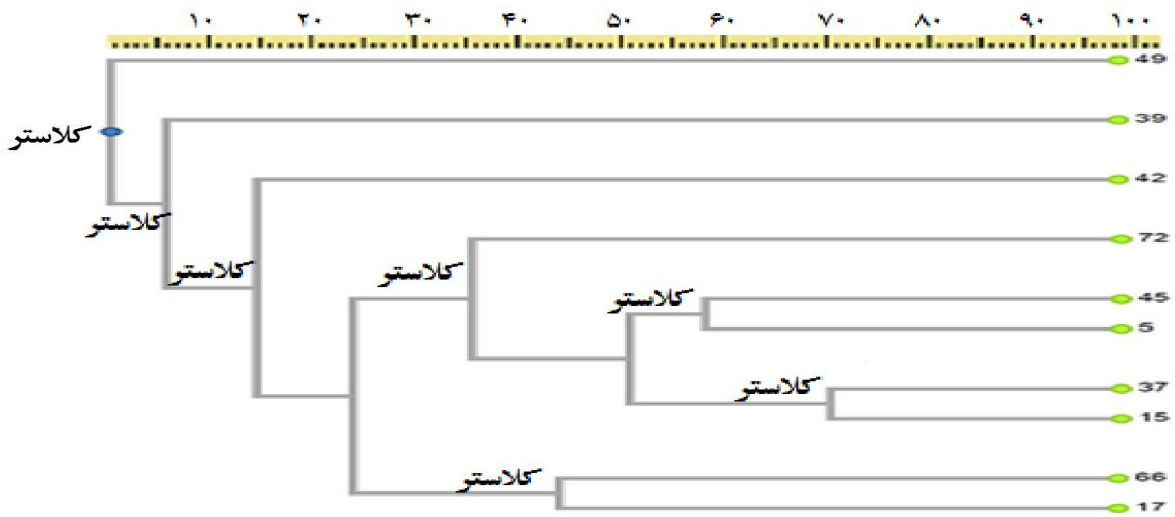


Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

آنالیز ۱۰ نمونه جدا شده از عفونت بیمارستانی به روش MLVA وجود ۱۰ الگو Pattern را نشان داد. با تشابه ۸۰ درصد هیچ کلاستری مشخص نشد اما با تشابه ۷۲ درصد (بیشترین تشابه) یک کلاستر قابل‌مشاهده بود و کلاستر غالب همان کلاستر شماره یک بود (شکل ۲).

شکل ۲- دیاگرام حاصل از نمودار تکاملی به دست آمده از توالی های تکراری پشت سر هم از سویه های پسودموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران دارای عفونت بیمارستانی



محاسبه تعداد تکرار برای هر لوکوس نشان داد که بیشترین تکرار مربوط به لوکوس ms194-5915 با ۱۹۵ تکرار بود (جدول ۶).

جدول ۶- تعداد تکرارهای لوکوس های مورد مطالعه برای هر سویه پسودموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران دارای عفونت بیمارستانی

شماره سویه های مورد بررسی	سویه استاندارد	ms010-0098	ms061-1844	ms077-2263	ms127-3496	ms142-3873	ms172-5083	ms173-5186	ms194-5915
۵	PAO1	۲۶	۳۸	۶	۸	۸	۳	۲	۱۳
۱۵	PAO1	-	-	۶	۸	۸	۳	۴	۱۳
۱۷	PAO1	۱۱	۱۹	۶	۸	-	۳	۴	۶۵
۳۷	PAO1	-	-	۶	۸	۸	۳	-	-
۳۹	PAO1	۵۲	۳۸	-	۴	۸	۳	۲	-
۴۲	PAO1	۶۵	۳۸	-	۸	۸	۳	-	۱۳
۴۵	PAO1	۶۵	۳۸	-	۴	۸	۳	۲	-
۴۹	PAO1	۳۰	۹۳	-	۸	۸	۹	۱	۱۹۵
۶۶	PAO1	۲۹	۱۸	۶	۸	۸	-	۴	-
۷۲	PAO1	-	۶۵	-	۸	۸	۳	۱	-

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

بحث

پسودوموناس آئروژینوزا یک باکتری بیماری زا در بیمارستان ها است و میزان بالای مقاومت دارویی چندگانه در این باکتری قابل مشاهده است (۷). در مطالعه حاضر، ۵۶ (۴۱/۷۹٪) سویه پسودوموناس آئروژینوزا مرتبط با عفونت بیمارستانی بودند و از بیمارستان های مختلف آموزشی در استان کردستان جداسازی شدند. بیشترین سویه های عفونت بیمارستانی مربوط به شهر سنندج بودند و از بیمارستان های توحید (۳۵/۵۵٪) و بعثت (۸۵/۴۲٪) جدا شدند و فقط یک نمونه (۱/۷۸٪) از بیمارستان فجر مریوان جدا شد. با توجه به اینکه این دو بیمارستان در مرکز استان قرار دارند ارجاع بیماران به این دو بیمارستان از شهرستان بیشتر است و بیشتر بیماران از شهرهای اطراف به این دو بیمارستان مراجعه می‌کنند، بنابراین بیشترین میزان عفونت در این بیمارستان ها دیده شد. بیشترین سویه های عفونت بیمارستانی جدا شده مربوط به بخش مراقبت های ویژه (۶۹/۶۴٪) بودند. همچنین در مطالعه ما بیشترین موارد عفونت بیمارستانی مربوط به نمونه های تراکئال یا نای بود (۵۱/۷۸٪). Ghazvini و همکاران در ایران در سال ۲۰۰۸ گزارش دادند که در بخش مراقبت های ویژه ۳۲ نوزاد مبتلا به عفونت بیمارستانی بودند و ۶/۲۵٪ از عفونت ها، مربوط به عفونت های مرتبط با پسودوموناس آئروژینوزا بودند که این میزان از مطالعه ما کمتر بود (۱۵). عوامل مختلف در بخش مراقبت های ویژه مانند گذاشتن لوله تراشه، شانت بطنی، کاتتر داخل عروقی، تغذیه وریدی با امولسیون های چربی، تشخیص اولیه، یافته‌های فیزیکی و اقدامات درمانی انجام شده در ایجاد این عفونت ها و تفاوت میزان بروز و درصد عفونت بیمارستانی در بیماران مختلف در مطالعات مختلف نقش دارد. همچنین عفونت های دستگاه تنفسی یکی از رایج ترین عفونت های بیمارستانی می‌باشند و به دلیل اینکه پسودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن باکتریایی فرصت طلب است، افراد در بخش مراقبت های ویژه که بدن ضعیف تری دارند بیشتر در معرض ابتلا به این عفونت می‌باشند و این نوع از عفونت در این بخش بیشتر قابل‌مشاهده است (۱۵،۱۰). Ghanbari و همکاران در ایران در سال ۲۰۱۸ گزارش دادند که میزان عفونت بیمارستانی ۵/۴٪ بود و ۱۰/۶٪ از نمونه‌های مرتبط با عفونت بیمارستانی مربوط به پسودوموناس آئروژینوزا بودند که این میزان از مطالعه ما کمتر بود (۱۶). از دیگر عواملی که علت اختلاف در بروز میزان عفونت های بیمارستانی در بیماران یک بیمارستان در مطالعات مختلف است می‌توان مدت اقامت بیمار در بیمارستان، درمان آنتی بیوتیکی، میزان مقاومت بیمار به آنتی‌بیوتیک‌ها و میزان رعایت عوامل بهداشتی را نام برد. همچنین بیمارانی که در معرض روش‌های تهاجمی در روند تشخیص و درمان، شیمی‌درمانی سرطان، ایمنوتراپی و پیشرفت در پیوند اعضا می‌باشند نسبت به بیماران دیگر آسیب پذیرتر هستند و بیشتر در معرض ابتلا قرار دارند؛ بنابراین شرایط بیمار نیز در میزان بروز عفونت های بیمارستانی در بیمارستان های مختلف و در مناطق مختلف تأثیر دارد (۱۷، ۱۶، ۸).

در این مطالعه روی ۱۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا که به‌صورت تصادفی انتخاب شدند MLVA انجام شد. وجود ده الگوی متفاوت در این روش آشکار شد که نشان دهنده تفاوت هایی بود که در این سویه ها وجود داشت. در تحقیقی که توسط Vu-Thien و همکاران در سال ۲۰۰۷ در فرانسه به روش MLVA انجام شد، ۱۶۳ سویه پسودوموناس آئروژینوزا در ۳۹ الگو قرار گرفتند (۱۸). در تحقیقی دیگر Lalancette و همکاران در سال ۲۰۱۷ در کانادا روی پسودوموناس آئروژینوزا انجام دادند، روش MLVA، ۴۱ سویه را در ۸ ژنوتایپ مختلف طبقه بندی کردند (۱۹). جهش ژنی و تغییرات ژنتیکی از طریق انتقال عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها، جزایر بیماری‌زایی، ترانسپوزان ها و کاست های ژنی در ژنوم باکتریایی بوفور رخ می دهد و علت تغییرات ژنتیکی است و در نتیجه به دنبال آن الگوی های مختلف ژنتیکی در تحقیقات مختلف اپیدمیولوژیکی قابل مشاهده می باشند (۱۹،۲۰). Parcell و

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

همکاران در سال ۲۰۱۸ در انگلستان تیپ بندی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا را به روش MLVA و PFGE انجام دادند. نتایج نشان داد که در این مطالعه تیپ بندی سویه ها متفاوت بود و هر دو روش مورد نیاز است تا منبع بالقوه عفونت را کاملاً مشخص کند (۲۱). تحقیقات نشان داده است که روش MLVA نسبت به تکنیک هایی دیگر مولکولی مانند PFGE دقت کمتری دارد، اما با توجه به اینکه که در این روش هر سویه با یک کد توصیف می شود که با تعداد تکرارها در VNTR در ارتباط است، آنالیز تعداد بسیار زیادی از نمونه ها را به راحتی امکان‌پذیر می‌کند. همچنین روش MLVA راهکاری عملی و دقیق به منظور تمایز سویه های پسودوموناس آئروژینوزا از یکدیگر است. این روش برای حجم بالایی از نمونه‌ها کاربرد دارد و نسبت سایر روش‌های اپیدمیولوژی کم‌هزینه‌تر و سریع تر است؛ بنابراین از این روش در تیپ بندی انواع باکتری ها می توان استفاده نمود (۲۲، ۸). در مطالعه حاضر عفونت‌های بیمارستانی توسط پسودوموناس آئروژینوزا نشان داده شد. روش اپیدمیولوژیکی MLVA وجود سویه های مختلف را با منشأ متفاوت نشان داد. در بررسی نتایج حاصل از این پژوهش و مقایسه با سایر گزارش‌های هم‌خوانی مشاهده می‌شود و در برخی موارد اختلافاتی به چشم می‌خورد که می‌توان علت آن را امکان خطا در حین انجام آزمایش و یا شرایط محیطی دانست. علاوه بر این توزیع سویه‌های مقاوم در مناطق جغرافیایی می‌تواند به دلیل شرایط اقلیمی، مصرف بیش‌ازحد آنتی‌بیوتیک و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آن منطقه متفاوت باشد (۲۳،۲۴). یافته‌های این تحقیق می تواند در یافتن منشأ سویه ها و چگونگی پراکنش و میزان آن در بیمارستان های مختلف و به دنبال آن کنترل و پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های مختلف، بخصوص بخش مراقبت‌های ویژه مؤثر باشد. همچنین جهت کنترل و پیشگیری از پراکنش و شیوع باکتری‌های مولد عامل عفونت بیمارستانی، دقت بیشتر کارکنان در زمان کار و رعایت بهداشت فردی، شستشوی مرتب دست ها و استفاده از دستکش استریل و همچنین رعایت تمام شرایط استریل بخصوص هنگام نصب کاتتر وریدی و دقت در تجویز و مصرف آنتی بیوتیک ها توصیه می شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه وجود عفونت ایجادشده توسط پسودوموناس آئروژینوزا را در بیمارستان‌های آموزشی استان کردستان بخصوص در شهر سنندج و در بخش مراقبت‌های ویژه نشان داد. همچنین روش اپیدمیولوژیکیMLVA نشان داد که سویه های مورد آزمایش از پراکنش ژنتیکی مختلف برخوردار بودند و ارتباط ژنتیکی ۱۰۰٪ نداشتند. با توجه به اینکه عفونت‌های بیمارستانی باکتریایی می‌تواند در افزایش مرگ‌ومیر بیماران مؤثر باشند، ایجاد مجموعه‌های میکروبی از نمونه‌های جدا شده از عفونت های بیمارستانی توسط مراکز بهداشتی و درمانی و تعیین الگوی تیپ بندی ژنتیکی ایزوله ها جهت تشخیص روش انتقال ایزوله ها در میان بیماران با تکنیک های دقیق تر و نهایتاً برنامه ریزی و بررسی دوره ای عفونت ها به همراه بررسی پراکنش جغرافیایی آن ها، کمک شایانی به کنترل، جلوگیری و درمان عفونت های ناشی از این باکتری خواهد نمود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجویی دوره دکترا (سمانه روحی) است. هزینه‌های مالی این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان و در قالب پایان نامه دانشجویی تأمین شده است. نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان کمال تشکر و قدردانی را اعلام می‌دارند.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019

References

1. Ali S, Birhane M, Bekele S, Kibru G, Teshager L, Yilma Y, et al. Healthcare associated infection and its risk factors among patients admitted to a tertiary hospital in Ethiopia: longitudinal study. Antimicrob Resist Infect Control 2018;7: 2.
2. Darvishpoor K, Heshmati H, Rezaei Manesh MR, Mir Hasani M. Prevalence of nosocomial infections and microbial causes in Torbat heydariyeh 9dey educational and clinical hospital in 2012 and 2013. Iran J Med Microbiol 2016;1:93-6. [In Persian]
3. Woods DE, Vasil ML. Pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa infections. In: Baltch A L, Smith R P, Editors. Pseudomonas aeruginosa infections and treatment. New York; N.Y: Marcel Dekker Inc,1994:21–50.
4. Marshall H, Carter R, Torbey M, Minion S, Tolson C, Sidjabat H. Mycobacterium lentiflavum in drinking water supplies, Australia. Emerg Infect Diseases 2011;17:395-402.
5. Jagielski T, Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur P, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of Mycobacterium tuberculosis and other Mycobacteria. Biomed Res Int 2014; 2014:1-21.
6. Beranek A, Mikula C, Rabold P, Arnhold D, Berghold C, Lederer I, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for subtyping of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis. Int J Med Microbiol 2009;299:43-51.
7. Onteniente L, Brisse S, Tassios PT, Vergnaud G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for Pseudomonas aeruginosa strain typing. J Clin Microbiol 2003;41:4991-7.
8. Johansson E, Welinder-Olsson C, Gilljam M, Pourcel C, Lindblad A. Genotyping of Pseudomonas aeruginosa reveals high diversity, stability over time and good outcome of eradication. J Cyst Fibros 2015;14:353-60.
9. Turton JF1, Turton SE, Yearwood L, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect 2010;16:1111-6.
10. Lavakhamseh H, Shakib P, Rouhi S, Mohammadi B, Ramazanzadeh R. A survey on the prevalence and antibiotic sensitivity of nosocomial infections in the Besat hospital, Sanandaj, Iran. JNI 2014;1:1-8.
11. Emori TG, Culver DH, Horan TC, Jarvis WR, White JW, Olson DR, et al. National nosocomial infections surveillance system (NNIS): description of surveillance methods. Am J Infect Control 1991;19:19-35.
12. Ramazanzadeh R, Rouhi S, Hosainzadegan H, Shakib P, Nouri B. Co-occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in isolated Enterobacter spp. from patients specimens in Sanandaj tertiary hospitals of Kurdistan province. Arch Clin Infect Dis 2016;11:e26837.
13. Mulamattathil SG, Bezuidenhout C, Mbewe M, Ateba CN. Isolation of environmental bacteria from surface and drinking water in Mafikeng, South Africa, and characterization using their antibiotic resistance profiles. J Pathog 2014;2014:1-11.
14. Fu S, Hiley L, Octavia S, Tanaka MM, Sintchenko V, Lan R, et al. Comparative genomics of Australian and international isolates of SalmonellaTyphimurium: correlation of core genome evolution with CRISPR and prophage profiles. Sci Rep 2017;7:9733.
15. Ghazvini K, Rashed T, Boskabadi H. Yazdan Panah M, Khakzadan F. Safaee H. Neonatal intensive care unit nosocomial bacterial infections. Tehran Univ Med J 2008;66:394-54. [In Persian]

16. Ghanbari F, Ghajavand H, Behshod P, Ghanbari N, Khademi F. Prevalence of hospital-acquired infections in hospitalized atients in different wards of Shariati hospital of Isfahan, 2014. J Health 2018;8:511-7.
17. Verma U, Kulshreshtha S, Khatri PK. MDR Pseudomonas aeruginosa in nosocomial infection: burden in ICU and burn units of a tertiary care hospital. Int J Curr Microbiol App Sci 2018;7:1267-74.
18. Vu-Thien H, Corbineau G, Hormigos K, Fauroux B, Corvol H, Clément A, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2007;45:3175-83.
19. Lalancette C, Charron D, Laferrière C, Dolcé P, Déziel E, Prévost M, et al. Hospital drains as reservoirs of Pseudomonas aeruginosa: multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis genotypes recovered from faucets, sink surfaces and patients. Pathogens 2017;6:pii: E36.
20. Messina JA, Thaden JT, Sharma-Kuinkel BK, Jr VGF. Impact of bacterial and human genetic variation on Staphylococcus aureus infections. PLoS Pathog 2016;12:e1005330.
21. Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M, Holden MTG, Phillips G, Turton JF, et al. Pseudomonas aeruginosa intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. J Hosp Infect 2018;98:282-8.
22. Elberse KE, Nunes S, Sá-Leão R, van der Heide HG, Schouls LM. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for Streptococcus pneumoniae: comparison with PFGE and MLST. PloS One 2011;6:19668.
23. Mohamadkhani AM. History familial with diseases of diagnosis the in approach its and genetics. Govaresh 2017;21:220-11.
24. Ramazanzadeh R, Rouhi S, Shakib P, Shahbazi B, Bidarpour F, Karimi M. Molecular characterization of isolated Vibrio cholera from clinical samples in Kurdistan province, Iran. Jundishapur J Microbiol 2015;8:e18119.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 9:02 +0330 on Saturday February 23rd 2019