

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

Samaneh Rouhi^{1,2}, Parviz Mohajeri³, 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, Nosocomial Infections Research Center, 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

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 one 1.78%). 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 سویه های پseudomonas 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، مرکز تحقیقات عفونتهای بیمارستانی، 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: ۰۸۷-۳۳۲۲۲۴۴۱، atrop_t51@yahoo.com

چکیده

مقدمه: شناسایی منبع پseudomonas آئروژینوزای عامل عفونت بیمارستانی عامل مهم در کنترل عفونت است. هدف از این مطالعه بررسی و تجزیه و تحلیل تعداد توالی های متغیر تکراری پشت سر هم چند لوکوسی جهت تیپ بندی سویه های پseudomonas آئروژینوزای عامل عفونت بیمارستانی است.

روش کار: مطالعه توصیفی-تحلیلی حاضر طی آذر ۱۳۹۴ الی اسفند ۱۳۹۶ در شهر سنندج روی ۱۳۴ نمونه بالینی پseudomonas آئروژینوزا انجام شد. آزمایش های فنوتیپی میکروب شناسی و PCR جهت تأیید پseudomonas آئروژینوزا انجام شد. تیپ بندی مولکولی به روش توالی های متغیر تکراری پشت سر هم 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 ($p \leq 0/05$).

یافته ها: درصد سویه های پseudomonas آئروژینوزا که مرتبط با عفونت بیمارستانی بودند ۴۱/۷۹٪ بود. بیشترین نمونه های بالینی عفونت بیمارستانی مرتبط با تراکتال (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 تراکتال ارتباط معنی داری مشاهده شد ($p \leq 0/05$). آنالیز ۱۰ سویه جداشده از عفونت بیمارستانی وجود ۱۰ الگو با تشابه ۷۲٪ را نشان داد.

نتیجه گیری: عفونت های بیمارستانی مرتبط با پseudomonas آئروژینوزا و پراکنش اپیدمیولوژیکی این باکتری در مطالعه ما نشان داده شد. بررسی منشأ باکتری های علت عفونت بیمارستانی گام مهم در پیشگیری و کنترل آن است.

کلمات کلیدی: توالی های متغیر تکراری پشت سر هم چند لوکوسی، پseudomonas آئروژینوزا، عفونت بیمارستانی
وصول مقاله: ۹۷/۶/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۹/۷ پذیرش: ۹۷/۹/۱۷

مقدمه

معمولاً عفونت‌هایی که بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از بستری شدن بیمار در بیمارستان ظاهر می‌شوند 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 (۱، ۲). در این میان باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری گرم منفی و بیماری زای فرصت طلب است و اصولاً در بیماران بستری، بیماران دارای کاتتر و بیماران دچار نقص سیستم ایمنی مثل نوتروپنی، بیماران دچار سوختگی و سیستمیک فیبروزیس ایجاد بیماری می‌کند (۳). پاک‌سازی *پسودوموناس* ها 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 ضد میکروبی دارد. بنابراین بررسی انتشار و وابستگی بین سویه‌های جدا شده از بیماران و ارتباط فیلوژنتیکی آن‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی جهت بررسی ابعاد اپیدمیولوژیک بیماری‌ها با اهمیت است (۵). از جمله این روش‌ها می‌توان به تعیین تعداد توالی‌های متغیر تکراری پشت سر هم Variable tandem repeat (VNTR) number اشاره کرد. هم‌اکنون روش VNTR از روش‌های رایج در جداسازی و شناسایی سویه باکتری‌ها است و برای تایپینگ باکتری‌ها از نظر اپیدمیولوژیک به کار می‌رود (۶). در تکنیک تجزیه و تحلیل لوکوس‌های چند گانه یا توالی‌های متغیر تکراری پشت سر هم، ابتدا انتخاب لوکوس‌های مورد نظر انجام می‌شود. سپس تکثیر توالی‌های حاوی VNTR به روش PCR انجام و نهایتاً آنالیز و تجزیه و تحلیل آن-Multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) صورت می‌پذیرد. در نهایت 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 روش‌های 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 سویه‌های میکروبی مولد این نوع عفونت مهم و قابل توجه است. در این رابطه نقش و اهمیت *پسودوموناس آئروژینوزا* با عفونت‌های بیمارستانی ثابت شده است. همان‌طور که گفته شد، ژنوم این باکتری غنی از توالی‌های تکراری است و این توالی‌ها ابزار مناسبی جهت تیپ بندی مکان‌های مختلفی جدا شده‌اند. تیپ بندی اپیدمیولوژیکی این باکتری می‌تواند اطلاعات بسیار مفید و مؤثری را در

مورد منشأ عفونت در اختیار پزشکان و کادر درمانی بگذارد که به وسیله آن درمان، کنترل و پیشگیری از عفونت‌های حاصل از این باکتری را تسهیل می‌کند. با توجه به جستجوهای متنوع و کامل در منابع، مطالعه‌ای کامل و جامع بر روی جداسازی، شناسایی و بررسی اپیدمیولوژی مولکولی پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های بیمارستانی از بیمارستان‌های استان کردستان یافت نشد؛ بنابراین با توجه به موارد ذکر شده مطالعه و تحقیق در مورد این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه، بررسی و تعیین رابطه ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای ایجاد کننده عفونت بیمارستانی به منظور ردیابی و ارزیابی سویه‌های منتشر در بیمارستان با استفاده از روش MLVA است.

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 عفونت‌های بیمارستانی (National nosocomial infections surveillance (NNIS) مراکز مدیریت و پیشگیری بیماری Centers for Disease Control and Prevention (CDC) و همچنین پرستاران کنترل عفونت در بیمارستان‌های 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 نمونه‌های بالینی آن‌ها به وسیله باکتری پseudomonas آئروژینوزا عفونی شده بودند. جمع‌آوری نمونه

تعیین حجم نمونه به صورت سرشماری از بیمارستان‌های آموزشی استان کردستان انجام شد. نمونه‌های بالینی پseudomonas 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 بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها در شهرهای مختلف جمع‌آوری شدند (کد اخلاقی: MUK.REC. 1394/337).

تشخیص و تأیید باکتری پseudomonas آئروژینوزا به روش فنوتیپی

جهت شناسایی فنوتیپی خانواده سودوموناس آزمایش‌های میکروب شناسی شامل رنگ آمیزی گرم (این باکتری به صورت باسیل‌های 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 به صورت کلنی‌های بی رنگ دیده می‌شود) (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 (پseudomonas آئروژینوزا تست ایندول منفی دارد)، حرکت در محیط سولفید ایندول موتیلیتی (این باکتری متحرک و دارای فلاژل است)، متیل رد و وگس پرسکوئر (پseudomonas آئروژینوزا تست متیل-رد و وگس پرسکوئر منفی دارد) کشت در محیط سیترات (این باکتری قادر به استفاده از سیترات می‌باشد 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 جداسازی گونه آئروژینوزا از سایر سودوموناس‌ها تست‌های 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 گلوکز را

اکسید و محیط را زرد می‌کند) (مرک، آلمان) انجام شد (۱۲).

استخراج DNA

در ابتدا جهت استخراج DNA از نمونه هایی که در مرحله اول (به وسیله تست های فوتیپی) به عنوان باکتری پسودوموناس آئروژینوزا مورد تأیید 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 سانتیفریوژ 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 آلودگی های پروتئینی جذب نوری Optimum Density (OD) تمامی DNA های استخراج شده در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر خوانده شد و تمام نمونه ها دارای OD بین ۱/۸-۲ بودند (OD ۱/۸-۲ مورد قبول است).

تشخیص و تأیید باکتری پسودوموناس آئروژینوزا به روش

PCR

روش PCR با استفاده از پرایمر های ژن ژیراز *gyrase B* یا *gyrB* به عنوان ژن Housekeeping جهت تأیید سویه های پسودوموناس آئروژینوزا استفاده شد (سویه های کنترل مثبت پسودوموناس آئروژینوزا دارای ژن *gyrB* از شرکت دارواش، 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: CGCAGCAGGATGCCGACGCC) با ساینز 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، طولی سازی اولیه در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طولی سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (۳۵ سیکل) جهت انجام PCR ژن *gyrB* مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای *gyrB* 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 به صورت نمونه گیری 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).

جدول ۱- خصوصیات سویه‌های پseudomonas 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	تراکتال
۱۵	۲۶	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکتال
۱۷	۵۸	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکتال
۳۷	۳۶	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکتال
۳۹	۶۵	مرد	سنندج	بعثت	جراحی عمومی	مایع پلورال
۴۲	۲۷	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکتال
۴۵	۵۰	زن	سنندج	توحید	انکولوژی	ادرار
۴۹	۴۹	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکتال
۶۶	۴۳	مرد	سنندج	توحید	جراحی مردان	ادرار
۷۲	۲۴	مرد	سنندج	بعثت	مراقبت های ویژه	تراکتال

درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه، واسرشتن ثانویه در ۹۶ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در ۶۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، طولی سازی اولیه در ۷۰ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه و طولی سازی نهایی در ۶۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه (۴۵ سیکل). برای سایر ژن‌ها نیز شرایط PCR به صورت زیر بود: واسرشتن اولیه در ۹۶ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه، واسرشتن ثانویه در ۹۶ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، طولی سازی اولیه در ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۹۰ ثانیه و طولی سازی نهایی در اولیه ۶۵ درجه سانتی گراد 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

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 به صورت زیر بود: واسرشتن اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه، واسرشتن ثانویه در ۹۶ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در ۶۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، طولی سازی اولیه در ۷۰ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه و طولی سازی نهایی در ۶۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه (۴۵ سیکل). همچنین برای ژن ms173-5186 شرایط PCR به صورت زیر بود: واسرشتن اولیه در ۹۶

باند‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت باند‌های ایجاد شده بر روی ژل‌ها که نشان دهنده اندازه هر کدام از توالی‌ها بود با استفاده از مارکر ۱۰۰ الی ۳۰۰۰ bp (سیناکلون، ایران) مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای 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	ردیف‌های نوکلئوتیدی	اندازه محصول (base pairs; bp) PCR
ms010-0098	L: GCAGGAACGCTTGCAGCAGGT R: CTTGCGCCGACCCAGGGATCA	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: ATTTACGCCAGCGTTACCAA	۳۵۰۳
ms194-5915	L: CCTTAGGAGGCGCTGGTC R: AGCTGCTGGCAAGGCTCT	۶۹۰

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون دقیق فیشر (Fisher Exact Test) و مجذور کای (Chi-squared test) انجام شد ($p \leq 0.05$). جهت بررسی فراوانی و برای بررسی اثر متغیرهای مستقل در حضور یکدیگر از مدل رگرسیون لجستیک استفاده شد ($p \leq 0.05$). در تجزیه و تحلیل روش VNTR یا MLVA، باند‌های حاصل از واکنش به‌وسیله نرم افزار آنالین <http://genomes.urv.es/UPGMA/> با استفاده از ماتریکس صفر و یک حاصل از وجود یا عدم وجود باند‌های 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).

$$\text{Copynumber} = \frac{\text{Amplicon size} - \text{Offset size}}{\text{Repeat size}}$$

یافته‌ها

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

جدول ۴- فراوانی عفونت بیمارستانی مرتبط با پseudomonas 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

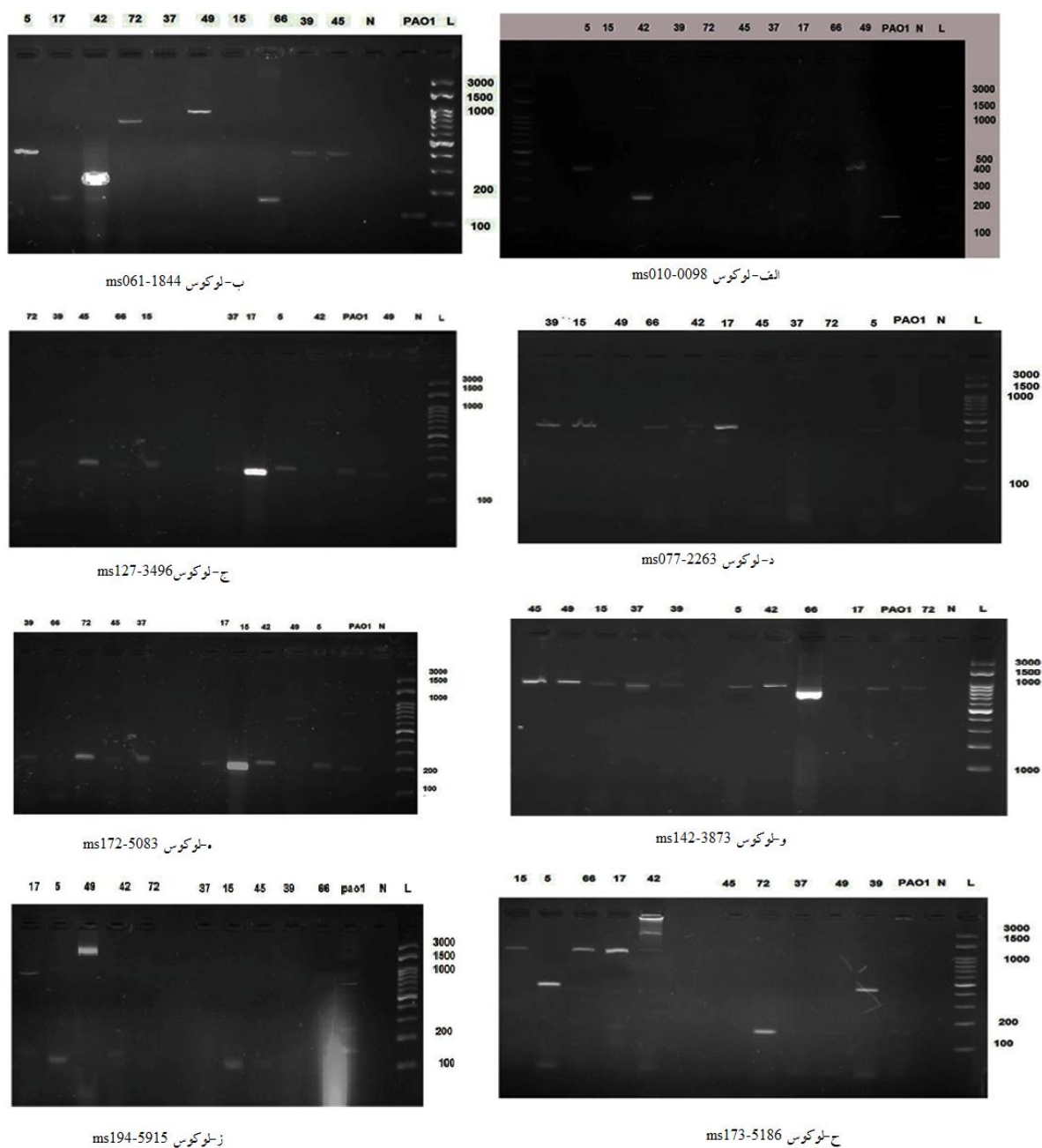
در این مطالعه بیشترین نمونه های عفونت بیمارستانی از بخش مراقبت های ویژه جدا شدند و بیشترین نمونه های بالینی مرتبط با عفونت بیمارستانی که از آن باکتری pseudomonas آئروژینوزا جدا شد، مربوط به نمونه تراکتال بود (جدول ۵).

جدول ۵- فراوانی عفونت بیمارستانی مرتبط با پseudomonas آئروژینوزای جدا شده از بخش ها 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 (%)
تراکتال	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 ($p \leq 0/05$). در روش MLVA پس از تکثیر ژن‌ها توسط PCR برای محصول به دست آمده از توالی‌های هر ۸ ژن، الکتروفورز بر روی ژل آگاروز صورت گرفت. شکل یک محصولات شکل ۱- الگوی مولکولی لوکوس‌های پseudomonas آئروژینوزا روی ژل به روش MLVA (L: لدر ۱۰۰-۳۰۰ bp، کنترل منفی: N، کنترل مثبت: پseudomonas آئروژینوزا PAO1)

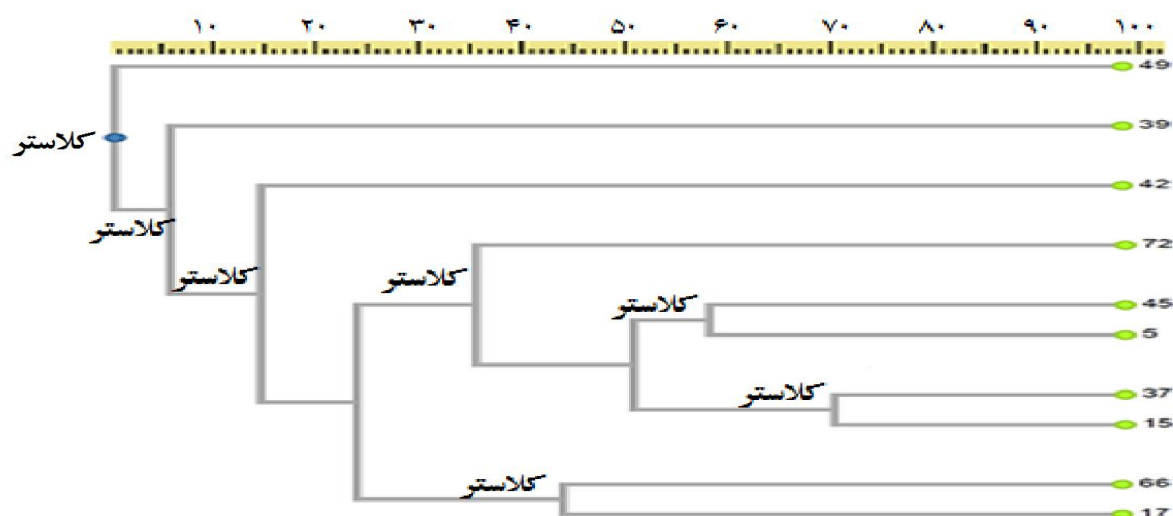
PCR الکتروفورز شده از هر کدام از ژن‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۱).



(بیشترین تشابه) یک کلاستر قابل مشاهده بود و کلاستر غالب همان کلاستر شماره یک بود (شکل ۲).

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

شکل ۲- دیاگرام حاصل از نمودار تکاملی به دست آمده از توالی های تکراری پشت سر هم از سویه های پseudomonas 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 پseudomonas 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	-

بحث

پseudomonas 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 پseudomonas 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 بیمارستان‌ها 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 تراکتال 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، یافته های 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 می باشند 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 می باشند و این نوع از عفونت در این بخش بیشتر قابل مشاهده است (۱۵،۱۰). Ghanbari و همکاران در ایران در سال ۲۰۱۸ گزارش دادند که میزان عفونت بیمارستانی ۵/۴٪ بود و ۱۰/۶٪ از نمونه های 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 می توان مدت اقامت بیمار در بیمارستان، درمان آنتی بیوتیکی، میزان مقاومت بیمار به آنتی بیوتیک ها و میزان رعایت عوامل بهداشتی را نام برد. همچنین بیمارانی که در معرض روش های تهاجمی در روند

تشخیص و درمان، شیمی درمانی سرطان، ایمونوتراپی و پیشرفت در پیوند اعضا می باشند 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 (۸، ۱۶، ۱۷).

در این مطالعه روی ۱۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا که به صورت 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 بیماری زایی، 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 همکاران در سال ۲۰۱۸ در انگلستان تیپ بندی سویه های 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 امکان پذیر می کند. همچنین روش MLVA راهکاری عملی و دقیق

به منظور تمایز سویه های پseudomonas آئروژینوزا از یکدیگر است. این روش برای حجم بالایی از نمونه ها کاربرد دارد و نسبت سایر روش های اپیدمیولوژی کم هزینه تر و سریع تر است؛ بنابراین از این روش در تیپ بندی انواع باکتری ها می توان استفاده نمود (۲۲، ۸). در مطالعه حاضر عفونت های بیمارستانی توسط پseudomonas 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 گزارش های هم خوانی مشاهده می شود و در برخی موارد اختلافاتی به چشم می خورد که می توان علت آن را امکان خطا در حین انجام آزمایش و یا شرایط محیطی دانست. علاوه بر این توزیع سویه های مقاوم در مناطق جغرافیایی می تواند به دلیل شرایط اقلیمی، مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک و مقاومت آنتی بیوتیکی در آن منطقه متفاوت باشد (۲۳، ۲۴). یافته های 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 عفونت های بیمارستانی در بخش های مختلف، بخصوص بخش مراقبت های ویژه مؤثر باشد. همچنین جهت کنترل و پیشگیری از پراکنش و شیوع باکتری های 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.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه وجود عفونت ایجاد شده توسط پseudomonas آئروژینوزا را در بیمارستان های آموزشی استان کردستان بخصوص در شهر سنندج و در بخش مراقبت های ویژه نشان داد. همچنین روش اپیدمیولوژیکی MLVA نشان داد که سویه های مورد آزمایش از پراکنش ژنتیکی مختلف برخوردار بودند و ارتباط ژنتیکی ۱۰۰٪ نداشتند. با توجه به اینکه عفونت های بیمارستانی باکتریایی می تواند در افزایش مرگ و میر بیماران مؤثر باشند، ایجاد مجموعه های میکروبی از نمونه های 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 پایان نامه دانشجویی دوره دکترا (سمانه روحی) است. هزینه های 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 می دارند.

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 *Salmonella* Typhimurium: 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. *Govareh* 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.