مقاله کوتاه

بررسی جمعیت‌شناختی مولکولی و حساسیت دارویی *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی زابل

فروغ حیدری[1]، زهرا راشکی قلعه‌نو[2]

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا*، یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی است که سالانه جان بیماران بسیاری را تهدید می‌کند. با توجه به توانایی ذاتی و اکتسابی این باکتری در ایجاد مقاومت به بسیاری از عوامل ضدّ میکروبی، شناسایی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کنترل مناسب آن اهمیت بالایی دارد. همچنین بررسی الگوی ژنتیکی ایزوله‌ها، در مدیریت عفونت‌های ناشی از این باکتری ضروری است. هدف از این مطالعه، بررسی تشابه ژنتیکی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD-PCR بود.

روش تحقیق: این مطالعه توصیفی- مقطعی، با هدف بررسی الگوهای ژنتیکی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری‌شده از بیمارستان‌های آموزشی زابل انجام شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی 100 ایزوله بالینی با روش انتشار دیسک و الگوهای ژنتیکی با روش RAPD-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: نشانگر ملکولی RAPD-PCR، درجه بالایی از چندشکلی را در میان ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در منطقه سیستان نشان داد؛ همچنین بین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و الگوی تنوّع ژنتیکی، هیچ‌گونه ارتباطی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که دندروگرام حاصل از RAPD-PCR، بیانگر کارآیی بالای این روش در مطالعه جمعیت‌شناختی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در منطقه سیستان است.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*؛ مقاومت آنتی‌بیوتیکی؛ RAPD-PCR

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1394؛ دوره 22 (4): 386-391 .

دریافت: **1393/12/21** پذیرش: **1394/12/04**

[1] کارشناس ارشد زیست‌شناسی- ژنتیک، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران.

[2] نویسنده مسؤول؛ استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران.

آدرس: زابل- دانشگاه علوم پزشکی زابل- دانشکده پزشکی- گروه میکروب‌شناسی

تلفن: 09151971410 نمابر:32232191- 054 پست الکترونیکی: zahrarashki@yahoo.co.uk

مقدمه

باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، از خانواده Pseudomonadaceae است که به‌عنوان سوّمین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی شناخته می‌شود (1). این باکتری به‌دلیل داشتن مقاومت‌های چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، نامطلوب شناخته شده است و می‌تواند در بیماران بستری‌شده در بخش‌های مهم بیمارستانی مانند: بخش‌های سوختگی و مراقبت‌های ویژه، عفونت‌های ثانویه ایجاد کند (2).

ژنوم سودوموناس، بیشترین تنوّع را در بین باکتری‌ها داراست. تنوع ژنتیکی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به‌علت توانایی سازگاری با میزبان‌ها و محیط‌های مختلف، واکنش‌های فنوتیپی متفاوتی ایجاد می‌کند. بنابراین برای شناسایی آن نمی‌توان فقط به تست‌های فنوتیپی اکتفا کرد؛ هر چند که روش فنوتیپی، روش دقیقی برای تشخیص می‌باشد (3). در بین روش‌های مولکولی، روش RAPD-PCR روش قابل اعتمادی است که با صحّت بسیار بالا و به‌طور موفقیت‌آمیزی در طبقه‌بندی و تعیین ارتباطات ژنتیکی بسیاری از ارگانیزم‌ها از جمله: قارچ‌ها، ویروس‌ها و گونه‌های سودوموناس مورد استفاده قرار می‌گیرد (4). با در نظر گرفتن تنوّع بالای گونه‌های سودوموناس در ایران و نیز پراکندگی آنها در مناطق مختلف کشور و عدم آگاهی و شناخت کامل از میزان تشابه ژنتیکی در بین ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، ضرورت انجام تحقیق روشن گردید.

روش تحقیق

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد 527 نمونه از خون، زخم، ترشحات ریه، خلط و ادرار از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی از ابتدای سال 1391 تا پایان سال 1392 جمع‌آوری گردید.

برای شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا*، ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های ستریماید آگار و مک‌کانکی آگار کشت داده شد و به‌مدّت 24 ساعت در دمای 37°C گرماگذاری گردید. سپس کلنی‌های رشدیافته برای انجام تست‌های تشخیصی و افتراقی از قبیل: رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، تست IMViC، توانایی حرکت و تولید پیگمان، توانایی تخمیر قندها در محیط TSI و رشد در دمای 42°C، مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفت. تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌روش دیسک‌دیفیوژن (Kirby-Bauer) و بر اساس استانداردهای CLSI انجام شد (5). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده (شرکت پادتن طب) شامل: سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، پیپراسیلین، سفتازیدیم، سفکسیم، توبرامایسین و پلی‌میکسین B بود که به‌فاصله 2/4 سانتی‌متر از یکدیگر (مرکز تا مرکز دیسک دیگر) روی محیط مولر هینتون آگار جاگذاری و به‌مدّت 24-18 ساعت در دمای 37°C گرماگذاری شد. قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید. از سویه *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC9027 به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

برای استخراج DNA ژنومی، ابتدا ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط Triptocase Soy (TSA) Agar به‌مدت 24-18 ساعت در دمای 37°C گرماگذاری گردید. سپس چند کلنی باکتری در 200 میکرولیتر آب مقطر استریل به‌صورت سوسپانسیون در آمد. سوسپانسیون به‌مدّت 15 دقیقه در دمای 100°C جوشانده شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی حاوی DNA برای انجام PCR در دمای 20°C- ذخیره گردید.

واکنش RAPD-PCR با استفاده از دو پرایمر تهیه‌شده از شرکت پیشگام انجام شد. برای انجام فرآیند PCR، آنزیم 2×Master Mix RED از شرکت پیشگام خریداری شد. در این واکنش 2 میکرولیتر از DNA الگو، 12/5 میکرولیتر از 2×Master Mix RED و یک میکرولیتر از پرایمر ACGGCCGACC:208 و پرایمر 272: AGCGGGCCAA (20 پیکومول در میکرولیتر)، با

یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به 25میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی اولیه (Denaturation) در دمای 95°C به‌مدّت 5دقیقه و سپس 30 سیکل تکثیر شامل: واسرشتگی در دمای 94°C به‌مدّت 60 ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای 36°C به‌مدّت 60 ثانیه، طویل‌شدن رشته الگو (Extension) به‌مدّت 120 ثانیه در دمای 72°C و طویل‌شدن نهایی (Final extension) به‌مدت 5دقیقه در دمای 72°C. پس از انجام واکنش، 5 میکرولیتر از محصولات واکنش در ژل آگارز 2% به‌مدّت 80دقیقه تحت تأثیر ولتاژ 75 الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر Ladder 100 ارزیابی شد.

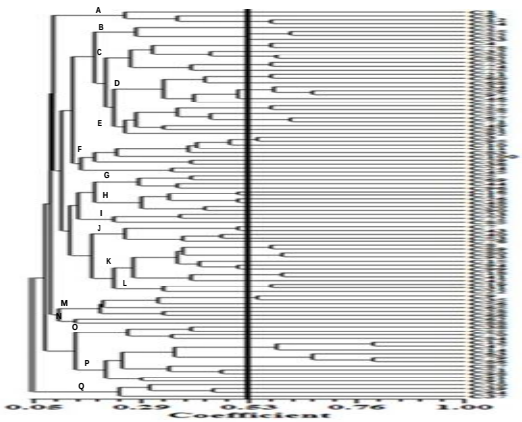
یافته‌ها

در این مطالعه، 100 نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* پس از کشت در محیط مولر هینتون آگار و انجام تست‌های بیوشیمیایی، تعیین هویّت شدند. نمونه‌های مختلف بالینی شامل: 61 مورد (61%) از لوله تراشه، 21 مورد (21%) از ادرار، 3 مورد (3%) از مدفوع، 8 مورد (8%) از خلط و 7 مورد (7%) از خون جداسازی شد. از تعداد 100 ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*، 11% به ایمی‌پنم، 7% به سیپروفلوکساسین، 15% به سفتازیدیم، 98% به سفکسیم، 4% به توبرامایسین و 7% به پیپراسیلین مقاوم بودند (جدول 1). نتایج حاصل از RAPD-PCR نشان داد که تمامی ایزوله‌های تحت مطالعه، با هر دو پرایمر مورد استفاده قابل تایپ بودند.

به طور کلی آنالیز شکل‌ها و دندروگرام حاصل از آنها (شکل 1) نشان داد که در هر دو پرایمر مورد استفاده، تمامی ایزوله‌ها در 17 کلاستر مجزا قرار داشتند و هر کدام حاوی چندین نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* بودند. کلاسترهای F و K بیشترین ایزوله را داشتند؛ در حالی که کلاستر N دارای دو ایزوله بود. نتایج حاصل از RAPD-PCR نشان داد که با استفاده از دو پرایمر طراحی‌شده، تمامی ایزوله‌ها از هم مجزا شده و الگوی متفاوتی را نشان دادند که خود نشانگر تمایز بالای این پرایمرها و در عین حال پلی‌مورفیسم ایزوله‌های مورد مطالعه است.

جدول 1- درصد فراوانی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

نام آنتی‌بیوتیک	ایمی‌پنم (10µg)	سیپروفلوکساسین (5µg)	سفتازیدیم (30µg)	سفکسیم (5µg)	توبرامایسین (10µg)	پیپراسیلین (100µg)
مقاوم	%11	%7	%15	%98	%4	%7
نیمه حساس	%2	%15	%13	0	%1	%9
حساس	%87	%78	%72	%2	%95	%84
جمع	100 (%100)	100 (%100)	100 (%100)	100 (%100)	100 (%100)	100 (%100)



شکل 1- دندروگرام نتایج RAPD-PCR

بحث

امروزه روش‌های مولکولی برای شناسایی و تمایز بین میکروارگانسیم‌ها بسیار کارآمدتر و مؤثّرتر از روش‌های فنوتیپی و کلاسیک قدیمی می‌باشند. در این بین، روش ملکولی RAPD-PCR به‌دلیل ویژگی‌هایی مانند: سریع و کم‌هزینه‌بودن، برخورداری از حساسیّت زیاد و عدم نیاز به مهارت تکنیکی بالا، مورد توجه می‌باشد؛ به طوری که در چندین مورد از اپیدمی‌های باکتریایی، توانسته‌اند با این روش منبع آلودگی را پیدا کنند (6).

در این مطالعه، تشابه ژنتیکی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های زابل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که هر دو پرایمر به کار رفته در این مطالعه، به‌طور قابل قبول عمل کردند؛ زیرا هیچ‌یک از دو ایزوله‌ها، الگوی باندی صد در صد مشابهی نداشتند.

در مطالعه‌ای که در کشور اسپانیا بر روی تنوّع ژنتیکی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* توسط روش MLST و آنالیز درخت فیلوژنی انجام گرفت، تنوّع بالایی حدود 99-100 درصد مشاهده شد (7). در مطالعه‌ای که در تهران با عنوان بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* توسط روش RAPD-PCR انجام شد، میزان شباهت ژنتیکی نمونه‌ها 40-100 درصد بود (8). در مطالعه حاضر میزان شباهت ژنتیکی 5-80 درصد بود که هیچ‌یک از صد نمونه، صد در صد به هم شبیه نبودند. در مطالعه‌ای که بر روی 573 ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد، مشاهده شد که 90درصد متعلّق به گروه‌های مشابهی بودند (9). در مطالعه‌ای با همین عنوان، میزان تنوّع ژنتیکی بالایی توسط آنالیز درخت فیلوژنی مشاهده شد که می‌تواند نتایج این مطالعه را تأیید کند (10).

نتایج حاصل، نشان‌دهنده بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سفکسیم (98%) و کمترین مقاومت به توبرامایسین، پیپراسیلین و سیپروفلوکساسین به‌ترتیب: 4%، 7% و 7% بود. در یک مطالعه در برزیل مشاهده شد که ایمی‌پنم بیشترین فعالیت را بر ضدّ *سودوموناس آئروژینوزا* دارد و سیپروفلوکساسین در درجه دوم قرار داشت (11).

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مقاله، استاندارد کردن روش RAPD-PCR و تهیه بانک‌های اطلاعاتی از الگوهای ژنومی، مقایسه سریع و دقیق سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* را در بین آزمایشگاه‌های مختلف امکان‌پذیر می‌کند و در تشخیص سریع آغاز یک اپیدمی و ردیابی منشأ آلودگی و در پی آن مدیریت کنترل عفونت اهمیت دارد. از این رو مطالعه حاضر از یک طرف با فراهم‌کردن اطلاعاتی در مورد تشابه ژنتیکی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و از طرف دیگر با بهینه‌سازی روش RAPD-PCR و نشان دادن توانایی دو پرایمر طراحی‌شده در تایپینگ این باکتری، در توسعه این دیدگاه و به‌کارگیری آن در مدیریت بهداشتی کشور حائز اهمیت می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بر خود لازم می‌دانیم از کلّیه عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تقدیر و تشکر نماییم.

منابع:

1- Yong D, Choi YS, Roh KH, Kim CK, Park YH, Yum JH, et al. Increasing prevalence and diversity of metallo-beta-lactamases in Pseudomonas spp., Acinetobacter spp., and Enterobacteriaceae from Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(5): 1884-6.

2- Fournier D, Richardot C, Muller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plesiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother. 2013; 68(8): 1772-80.

3- Ktari S, Mnif B, Znazen A, Rekik M, Mezghani S, Mahjoubi-Rhimi F, et al. Diversity of beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa isolates producing metallo-beta-lactamase in two Tunisian hospitals. Microb Drug Resist. 2011; 17(1): 25-30.

4- Tafvizi F, Tajabadi ebrahimi M, Heydari Nasrabadi M, Bahrami H. Detection of genetic diversity of lactobacillus species isolated from different traditional dairy products by RAPD markers. New Cell Mol Biotech J. 2011; 1(3): 33-42. [Persian]

5- Franklin R, Cockerilli, Matthew A. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement, M100-S22; Clinical and laboratory Standard Institute; 2012; Vol. 31; No 1.

6- Nucci C, da Silveira WD, da Silva Correa S, Nakazato G, Bando SY, Ribeiro MA, et al. Microbiological comparative study of isolates of Edwardsiella tarda isolated in different countries from fish and humans. Vet Microbiol. 2002; 89(1): 29-39.

7- Gomila M. Emergence of carbapenemases in Pseudomonas aeruginosa: a worldwide problem. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013; 12(1): 9-11.

8- Taheri D, Talebi A, Taghaodi M, Fesharakizadeh M, Mortazavi M, Azhir A, et al. Pathological diagnosis of antibody-mediated rejection in renal allograft without c4d staining, how much reliable? Adv Biomed Res. 2012; 1: 40.

9- R?mling U, Wingender J, Müller H, Tümmler B. A major Pseudomonas aeruginosa clone common to patients and aquatic habitats. Appl Environ Microbiol. 1994; 60(6): 1734-8.

10- Ruimy R, Genauzeau E, Barnabe C, Beaulieu A, Tibayrenc M, Andremont A. Genetic diversity of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. Infect Immun. 2001; 69(1): 584-8.

11- Sader HS, Mallick R, Kuznik A, Fritsche TR, Jones RN. Use of in vitro susceptibility and pathogen prevalence data to model the expected clinical success rates of tigecycline and other commonly used antimicrobials for empirical treatment of complicated skin and skin-structure infections. Int J Antimicrob Agents. 2007; 30(6): 514-20.

Abstract *Short Communication*

Epidemiology and Drug Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains isolated from Patients admitted to Zabol hospitals

Forough Heydari[1], Zahra Rashki Ghalehnoo[2]

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causative agents of nosocomial infections that threatens many lives **..** Regarding the innate and adaptive ability of the bacteria species to become resistant to many antimicrobial agents**,** recognition of different antibiotic resistance patterns is extremely significant in assessing the validity of the monitoring programs. Also, the pattern of genetic isolates is essential in the management of infections caused by these bacteria. The purpose of this study was to determine genetic diversity and patterns of antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* isolates using RAPD-PCR.

Materials and Methods: The present study aimed at assessing the genetic diversity and antibiotic resistant pattern of *P. aeruginosa* isolates in the educational Zabol hospitals. Thus, antibiotic susceptibility of 100 isolates was determined applying Kirby-Bauer disk diffusion method.

Results: RAPD-PCR data revealed a high level of polymorphism among the isolates of *P. aeruginosa* in Sistan. But, no association was observed between antibiotic susceptibility and genetic diversity pattern.

Conclusion: In the present study, we RAPD-PCR technique was found to be a useful means for the investigation of the genetic variation and epidemiological study among *P. aeruginosa* isolates collected from Sistan region.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa;* Antibiotic resistance*; RAPD-PCR*

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2016; 22 (4): 386-391

Received: March 12, 2015 ***Accepted: February 23, 2016***

1 MSc in Genetic, Food and Drug Adjutancy , Zabol University of Medical Science, Zabol, Iran
2 Corresponding Author; Assistant professor in Microbiology and Molecular Genetics, Department of Microbiology , Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Science, Zabol, Iran zahrarashki@yahoo.co.uk