

آنالیز نواحی تکراری چند ناحیه ای (MLVA) به منظور تیپ بندی سویه های سودوموناس آئروژینوزای عامل عفونت ادراری

حامد اسمعیل لشگریان (PhD)^۱، عبدالرزاق مرزبان (PhD)^۲، محمد استاجی (MSc)^۳، مریم غلامی (MSc)^۴،
حسین معصومی اصل (PhD)^۵، جمشید راهب (PhD)^{*}

۱- مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۲- مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۳- گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۴- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران

۵- مرکز تحقیقات عفونی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

دریافت: ۹۶/۴/۲۰، اصلاح: ۹۶/۷/۲۳، پذیرش: ۹۶/۹/۸

خلاصه

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از شایع ترین عوامل عفونت های ادراری در بیمارستان ها می باشد. هدف از این مطالعه تعیین تیپ تعدادی از جدایه های بدست آمده از بیماران به روش MLVA به منظور رسیدن به یک الگوی ژنتیکی مشخص برای دسته بندی آنها می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۷۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه ادراری بیماران در بیمارستان های تهران جمع آوری شد. برای بررسی ژنوتیپی براساس روش MLVA، ابتدا از نمونه ها استخراج DNA ژنومی انجام شد. سپس توالی های تکراری پشت سرهم (VNTR) موجود در ژنوم باکتری ها که درون نواحی ژنی MS-213، MS-214، MS-215، MS-217، MS-222، MS-223، MS-142 و MS-173 قرار داشتند، توسط پرایمرهای اختصاصی به روش PCR تکثیر شدند. پس از اطمینان از تکثیر ژن های مورد نظر با استفاده از ژل الکتروفورز، ارتباط تکاملی و تیپ بندی آنها با روش MLVA بررسی شد.

یافته ها: بعد از الکتروفورز محصول PCR و تعیین تعداد VNTR ها، ۷۰ سویه بدست آمده در ۳۹ تیپ دسته بندی شده و نمودار درخت تکاملی ژنی رسم گردید. بر اساس الگوی MST، ۷۰ سویه بالینی به ۱۱ کمپلکس کلونال (clonal complex) تقسیم شدند که این معیار نشان دهنده فاصله ژنتیکی بر اساس اختلاف در تعداد VNTR در هر یک از گروه ها بود.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که MLVA یک روش موثر برای تیپ بندی سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا می باشد. نتایج بدست آمده نشان دهنده پتانسیل بالای این روش در تمایز بین سویه هایی که از نظر فنوتیپی بسیار شبیه به یکدیگر بود، می باشد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، تیپ بندی ژنتیکی، عفونت ادراری، آنالیز نواحی تکراری چند ناحیه ای (MLVA)، VNTR.

مقدمه

قادر به حرکت می باشد. در رابطه با پاتوژن یا بیماری زایی، سودوموناس ها دارای طیف متعددی از مکانیسم های تهاجمی می باشند، از جمله اجزای ساختمانی ارگانیسم، سم ها یا توکسین ها و آنزیم هایی که نقش مهمی در بیماری زایی میکروارگانیسم بازی می کنند. سودوموناس ها نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها به طور مشخص مقاومت نشان می دهند. حتی در میکرو اورگانیسم های حساس، مقاومت می تواند در طی دوره درمانی توسط القای آنزیم های غیر فعال کننده آنتی بیوتیک (مانند بتالاکتامازها) یا انتقال مقاومت با واسطه پلاسمید از یک ارگانیسم مقاوم به ارگانیسم حساس گسترش یابد (۵). براساس اصول میکروشناسی، عفونت دستگاه ادراری زمانی وجود دارد که میکروارگانیسم های پاتوژنیک یا بیماری زا در داخل ادرار یا لوله حالب یا کلیه و یا پروستات یافت شوند. بطور کلی طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها قادر به ایجاد عفونت ادراری می باشند.

سودوموناس ها یکی از جنس های باکتریایی است که توانایی متابولیسمی بسیار بالایی دارد. این باکتری شامل گونه های مختلفی اعم از غیربیماریزا و بیماری زای فرصت طلب می باشد. این جنس از باکتری همچنین در سراسر محیط بیمارستان ها در مخازن مرطوبی مانند غذاها، گل های چیده شده، ظرفشویی ها، توالت ها، کف شوی ها، وسایل درمان تنفسی و حتی محلول های ضدعفونی کننده یافت می شوند (۱ و ۲). امروزه این باکتری به عنوان یکی از باکتری هایی که موجب شیوع عفونت های بیمارستانی علی الخصوص عفونت های ادراری، مطرح می باشد. سودوموناس آئروژینوزا شایع ترین گونه سودوموناس است که در بیمارستان ها سبب ایجاد مشکلات زیادی برای بیماران در بالین می گردد (۳ و ۴). سودوموناس ها باسیل های گرم منفی گاهی دارای خمیدگی و در بیشتر موارد میله ای راست می باشند. این باکتری به واسطه داشتن تازک های قطبی

این مقاله حاصل پایان نامه محمد استاجی دانشجوی رشته ژنتیک مولکولی و طرح تحقیقاتی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر جمشید راهب

آدرس: تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه پزشکی مولکولی. تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۶۴۷۹۲

E-mail: jam@nigeb.ac.ir

بندی باکتری های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های ادراری بیماران دارای عفونت ادراری بر اساس توالی های تکراری پشت سر هم توسط تکنیک MLVA بررسی شد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: در این مطالعه نمونه های ادرار از بیماران در بخش های مختلف اعم از اورژانس، CCU، ICU، زنان، مردان، اطفال و بیماران سر پایی جمع آوری شد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه همه آنها بر روی محیط کشت نوریت آگار کشت داده شدند. این نمونه ها در مرحله بعدی برای جداسازی سویه های سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی اختصاصی قرار گرفتند. پس از اینکه نمونه های حاوی سویه های سودوموناس آئروژینوزا به روش های رایج و با کیت های اختصاصی آزمایشگاهی مورد تأیید قرار گرفتند، از هر کدام کشت خالص بر روی محیط کشت نوترینت آگار تهیه شده و برای مدتی تا انجام مراحل آزمایش در یخچال نگهداری شدند.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA، از کیت G-spin Genomic DNA Extraction Kit (آلمان، Roche) استفاده شد. ابتدا باکتری ها در محیط کشت نوترینت برات کشت داده و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، ۱ میلی لیتر از کشت باکتری را برداشته و درون ویال های استریل ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید. در ادامه مایع را را دور ریخته، سپس ۵۰ میکرو لیتر محلول پره بافر کیت و ۳ میکرو لیتر لیزوزیم را به رسوب سلولی اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداشته شد. پس از آن به ترتیب مقدار ۲۵۰ میکرو لیتر از محلول G بافر و مقدار ۲۵۰ میکرو لیتر از binding buffer اضافه گردید و هر بار خوب مخلوط شدند. در مرحله بعد، محصول متلاشی شده سلولی بر روی ستون ها لود گردید و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ انجام گرفت. بعد از شست و شوی ستون، ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول الوشن بافر به طور مستقیم روی غشاء ستون ریخته شد. محلول حاصل به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. DNA استخراج شده پس از اینکه توسط اسپکتروفتومتر (مرک، آلمان) تعیین مقدار شد، جهت انجام الکتروفورز و سپس تکثیر به روش PCR در یخچال نگه داری شد.

تکثیر DNA به روش PCR: پس از استخراج DNA ژنومی تکثیر ژن ها و توالی های مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آنها (جدول ۱) به روش PCR انجام شد. این پرایمرها از مطالعات انجام شده توسط سایر محققین استخراج و مورد استفاده قرار گرفت (۱۲ و ۱۳).

ولی شایع ترین عوامل، باسیل های گرم منفی از جمله اشیریشیا کلی، سودوموناس، کلبسیلا و سراشیا می باشند (۶). اخیراً روش هایی بر پایه تکنیک های مولکولی به منظور تیپ بندی میکروارگانیسم های ایجادکننده بیماری ابداع شده است. از جمله این روش ها می توان از روش هایی که برپایه استفاده از آنزیم های محدود کننده استوار است به روش های ریبوتایپینگ PFGE، AFLP، RFLP و لکه گذاری Southern اشاره کرد. این روش های گفته شده علاوه بر مزایای زیاد آنها هر کدام دارای مشکلات مربوط به خود می باشند. برای مثال از تکنیک PFGE نیازمند مهارت فراوان، تجهیزات بخصوص، اندونوکلازهای گران قیمت است، همچنین زمان زیادی باید صرف انجام تکنیک کرد (۷). تکنیک AFLP بخاطر مرحله افزودن آدپتور بسیار زمان بر و گران قیمت است (۸).

یکی از تکنیک های ساده، سریع، مقرون به صرفه و قابل اعتماد برای تیپ بندی میکروارگانیسم ها تکنیک MLVA می باشد. این تکنیک MLVA تا کنون برای تیپ بندی باکتری هایی از قبیل سالمونلا، لیستریا منوسایتوجنز و اشیریشیا کلی توسعه یافته است (۹). اساس تکنیک MLVA شناسایی تعداد تکرارهای پشت سرهم (VNTR) در لوکوس های خاص روی ژنوم میکروارگانیسم است (۱۰).

در تکنیک MLVA پس از انتخاب لوکوس های مورد نظر و طراحی پرایمر برای آنها، و استخراج DNA سویه های مورد نظر، تکثیر توالی های حاوی VNTR به روش PCR انجام می پذیرد. در ادامه محصول بدست آمده از PCR تعیین توالی شده و تعداد تکرار محاسبه می گردد. با توجه به اینکه در ژنوم موجودات یک سری از توالی های تکراری پشت سرهم بنام VNTR وجود دارد که این توالی ها از نظر ساختاری و بازهای تشکیل دهنده مانند یکدیگر می باشند. تنها تفاوت در تیپ های مختلف تعداد تکرارهای پشت سرهم از یک VNTR است (۱۱). در جنس سودوموناس توالی های تکراری شناسایی شده است که در این پژوهش از چند مورد آنها که شامل MS-213، MS-214، MS-215، MS-217، MS-222، MS-223، MS-142 و MS-173 می شود جهت تیپ بندی سویه ها استفاده شده است.

این توالی ها که دارای تکرارهای متفاوتی در سویه های مختلف از سودوموناس آئروژینوزا می باشد ابزار مناسبی برای طبقه بندی زیرگونه های سودوموناس آئروژینوزا می باشد که از بیماران مختلف و یا از مکان های مختلفی بدست آمده است. با توجه به اینکه تیپ بندی سویه های پاتوژن بیمارستانی می تواند اطلاعات بسیار مفیدی به منظور طراحی یک روش درمانی موثر در اختیار پزشکان و کادر درمانی بگذارد این مطالعه با این هدف که بتوان به یک الگوی مشخص و قابل اعتمادی دست یابیم، انجام گرفت. بنابراین در این پژوهش تیپ

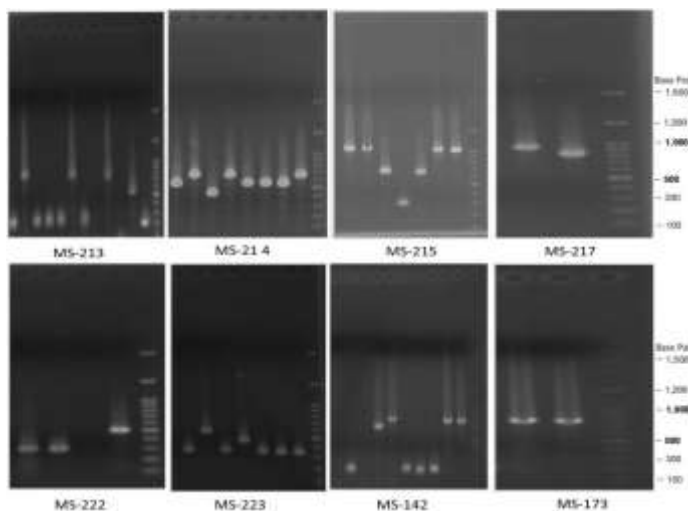
جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژن ها و نواحی تکراری ژنی برای تکثیر به روش PCR (۱۲)

اندازه (bp)	پرایمر	نام ژن	اندازه (bp)	پرایمر	نام ژن
۱۰۱	F-TGCAGTTCTGCGAGGAAGGCG R-AGAGGTGCTTAACGACGGAT	MS-222	۱۰۳	F-TGGCGTACTCCGAGCTGATG R-CTGGGCAAGTGTGGTGGATC	MS-213
۱۰۶	F-TGAGCTGATCGCCTACTGG R-TTGGCAATATGCCGGTTTCGC	MS-223	۱۱۵	F-CCATCATCCTCCTACTGGGTT R-AAACGCTGTTGCGCAACCTCTA	MS-214
۱۱۵	F-GTGGGGCGAAGGAGTGAG R-AGCAGTGCCAGTTGATGTTG	MS-142	۱۲۹	F-CTGTACAACGCCGAGCCGTA R-GACGAAACCCGTCGCGAACA	MS-215
۲۴۳	F-CTGCAGTTCGCGCAAGTC R-ATTTTCAGCCAGCGTTACCAA	MS-173	۱۰۹	F-GAACAGCGTCTTTTCCTCGC R-TTCTGGCTGTCGCGACTGAT	MS-217

تیپ‌های بدست آمده بیشترین تعداد متعلق به تیپ ۱ با ۱۰ سویه بود. پس از آن تیپ‌های ۲ و ۶ هر کدام ۵ سویه را شامل می شدند. در ادامه تیپ های ۳ و ۴ بودند که ۳ سویه و تیپ های ۷ تا ۱۴ شامل ۲ سویه بودند. و در انتها هم سایر تیپ ها بودند که تنها یک سویه را در بر می گرفتند (جدول ۳).

جدول ۲. فراوانی باکتری های جدا شده از بخشهای مختلف بیمارستان ها

منشاء جداسازی	تعداد جدایه	درصد جدایه از کل
ICU	۳۷	۵۲/۹
CCU	۳	۴/۳
MEN	۳	۴/۳
WOMEN	۴	۵/۷
EMERGENCY	۳	۴/۳
CHILDREN	۴	۵/۷
O.P.D	۱۶	۲۲/۸



شکل ۱. ژل الکتروفورز بدست آمده از محصول PCR ژن هایی که جهت آنالیز و تیپ بندی سویه مورد استفاده قرار گرفته اند.

شکل ۲ درخت تکاملی ژنی ۷۰ سویه جداسازی شده را که توسط نرم افزار UPGMA رسم شده است نشان می دهد. در این درخت فیلوژنی ارتباط بین سویه های مختلف بر اساس شباهت در تکرارهای آنها در یک شاخه قرار گرفته اند. طول هر شاخه نیز تفاوت در تعداد تکرارها را در شاخه های مختلف نشان می دهد (۱۴). شکل ۳ الگوی MST (Minimum spanning tree) حاصل از آنالیز MLVA برای سویه های مورد نظر را نمایش می دهد. در این شکل ۷۰ سویه ای که در ۳۹ تیپ دسته بندی شده اند بر اساس تعداد سویه ای که در دسته بندی قرار گرفته است بصورت یک کلون ارائه شد است. در مجموع الگوی MST بدست آمده در این پژوهش شامل ۱۱ کمپلکس کلونال ((clonal complex (CC می شود. این مفهوم برگرفته از ارتباط و نزدیکی بین تعداد تکرارهایی است که در هر یک از تیپ بندی ها بعنوان شاخص مقایسه در نظر گرفته شده است. فاصله بین هر CC نشان دهنده مارکرهایی هست که در هر کلون مشترک هستند. و در صورتیکه اشتراک بین شاخص ها بیشتر باشد

بدین منظور $dNTP$, $MgCl_2$ و بافر این واکنش به صورت Master mix از شرکت سینا کلون ایران تهیه گردید. مخلوط این واکنش که شامل ۷ میکرولیتر PCR Master mix، ۰/۵ میکرولیتر Primer Forward، ۰/۵ میکرولیتر Primer Reverse، ۱۶ میکرولیتر ddH₂O و ۱ میکرولیتر Template DNA تهیه شده بود، و با استفاده از چرخه حرارتی ۴۰ ثانی شامل یک مرحله واسرشتی اولیه در دمای ۹۵°C برای ۱۰ دقیقه، سپس مراحل واسرشتی برای چرخه های بعدی در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله Annealing در دمای ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله Extension در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک مرحله Final Extension در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بود (۱۲).

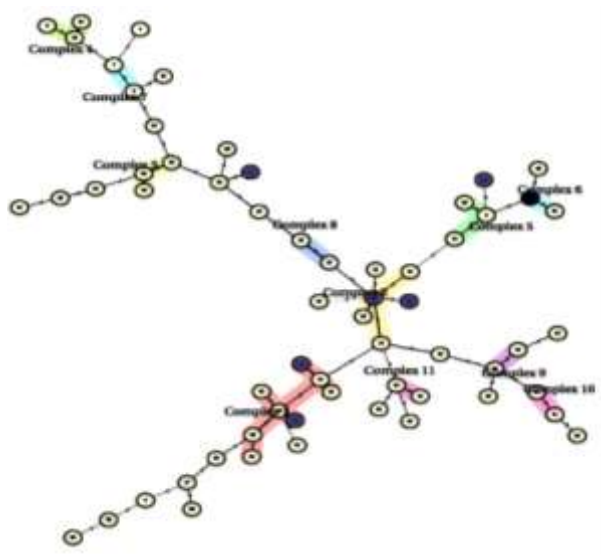
الکتروفورز: برای تایید انجام واکنش PCR از محصول بدست آمده الکتروفورز بر روی ژل آگاروز با غلظت ۱ درصد انجام شد. بدین منظور ژل آگاروز ۱ درصد در بافر TBE (۰/۵x) تهیه و بعد از حرارت و خنک شدن آن ۵ میلی لیتر محلول اتیدیوم بروماید (Qiagen، آمریکا) اضافه شد و درون قالب ریخته شد. برای بارگذاری ژل مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR را با ۱ میکرولیتر رنگ loading dye مخلوط کرده و در داخل چاهک های مخصوص ریخته شد. برای تعیین اندازه محصول های PCR از سایز مارکر تجارتي ۱۰۰ bp plus استفاده گردید. در مرحله بعد دستگاه الکتروفورز را بر روی ولتاژ ۸۰ تنظیم کرده و پس از اتمام الکتروفورز، ژل ها دستگاه UV Documentation Gel (Upland، آمریکا) قرار داده و عکس از آنها تهیه شد.

رسم نمودار ارتباط تکاملی و تعیین تیپ سویه ها: جهت رسم نمودار تکاملی دادهها وارد نرم افزار موجود در سایت <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping> شده و دندروگرام حاصل برای تیپ بندی جدایه ها، بر اساس ضریب طبقه ای و الگوریتم UPGMA رسم شد. برای این منظور سویه هایی که دارای ۸۰ درصد یا بیشتر از ۸۰ درصد تعداد تکرار یکسان بودند (بر پایه تفاوت در ۲ لوکوس (VNTR (DLV) در یک تیپ و سایر سویه ها را در تیپ های مختلف قرار گرفتند.

یافته ها

جداسازی سویه ها: از میان ۷۰ سویه جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری تعداد ۴۴ جدایه (۶۳ درصد) از بیماران زن و تعداد ۱۹ جدایه از بیماران مرد (۲۷ درصد) بدست آمد. از میان ۷۰ جدایه، تعداد ۳۷ سویه از بخش ICU (۵۲/۹ درصد)، ۳ سویه از بخش CCU (۴/۳ درصد)، ۳ سویه از بخش مردان (۴/۳ درصد)، ۴ سویه از بخش زنان (۵/۷ درصد)، ۳ سویه از بخش اورژانس (۴/۳ درصد)، ۴ سویه از بخش اطفال (۵/۷ درصد) و تعداد ۱۶ سویه (۲۲/۸ درصد) از بیماران سرپایی مراجعه کننده به آزمایشگاههای تشخیص طبی بود (جدول ۲).

تیپ بندی سویه ها: پس از تکثیر ژن ها توسط PCR برای محصول بدست آمده از توالی های هر ۸ ژن الکتروفورز بر روی ژل آگاروز صورت گرفت (شکل ۱). باندهای ایجاد شده بر روی ژل ها که نشان دهنده اندازه هر کدام از توالی ها بود توسط نرم افزار Gene tools از طریق مقایسه با مارکر ۱۰۰ bp (ZR 100 DNA Marker™) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از تعیین توالی و بررسی میزان تکرار ها در ۷۰ سویه، ۳۹ تیپ به دست آمد. از این



شکل ۳. الگوی MST بدست آمده از جدایه های بالینی عامل عفونت ادراری در بیماران مختلف. کلنال کمپلکس های مشاهده شده در این شکل نشان دهنده ارتباط بین چند مارکر مشترک (قسمت رنگی) و فاصله بین آنها تفاوت در تعداد تکرارها را نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری

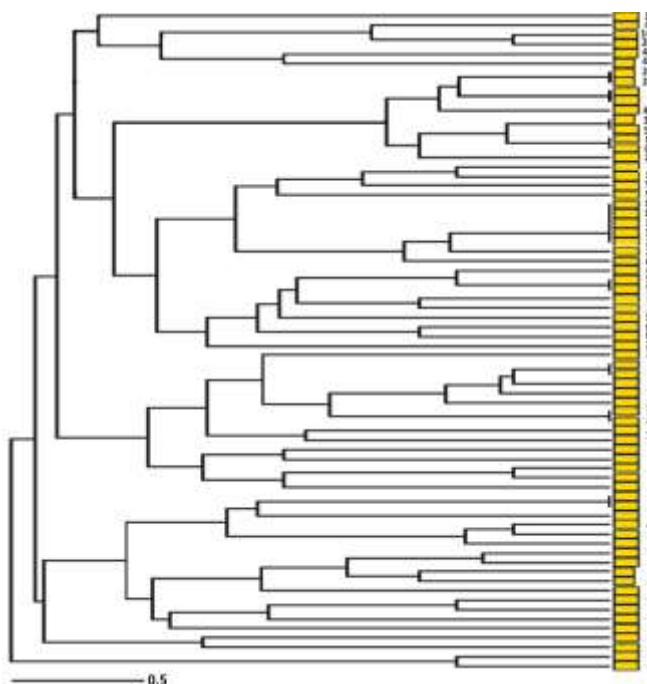
در این تحقیق تعداد ۷۰ نمونه از سویه های مختلفی از سودوموناس آئروژینوزا از طیف وسیعی از بیماران اعم از افراد بستری در بخش های ICU و CCU تا افرادی که بصورت سرپایی درمان شده اند جداسازی شد. این سویه ها علیرغم اینکه از نظر خصوصیات بیوشیمیایی و آنالیزهای رایج شباهت زیادی به یکدیگر داشتند، ولی در آنالیز MLVA در تیپ بندی به تعداد ۳۹ تیپ دسته بندی شدند. این تعداد تیپ بدست آمده از سویه های سودوموناس آئروژینوزا نشان دهنده دقت بالای این روش در تمایز تفاوت هایی بود که در این سویه ها وجود داشت. این تفاوت ها که منجر به ایجاد تیپ های متفاوت در روش MLVA شد نشان داد با روش های رایج بیوشیمیایی به هیچ وجه قابل تشخیص نبود. عفونت دستگاه ادراری (UTI) یکی از سه عامل بسیار رایج در جامعه، بخصوص و در سطح بیمارستان است. عفونت ادراری ناشی از آلودگی به باکتری های بیماری زا پس از عفونت دستگاه تنفسی مهم ترین نوع عفونت در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان ها می باشد (۱۷).

بیماران مبتلا به عفونت های ادراری بسیار متنوع بوده، بطوریکه طیف وسیعی از سویه های باکتریایی با خصوصیات و بیماریزایی متفاوت شناسایی و گزارش شده است (۱۸ و ۱۹). با توجه به تنوع بالایی که در سویه های بیماری زایی که از بیماران از بخش های مختلف بدست می آید که این سویه ها غالباً حامل ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند، محققین به دنبال راهکارهایی عملی و دقیق تری به منظور تمایز این سویه های نزدیک به یکدیگر می باشند. از آنجائیکه روش های تشخیصی برای حجم بالایی از نمونه های بالینی علاوه بر زمانبر بودن، هزینه زیادی نیز به دنبال خواهد داشت، در نتیجه اهمیت تکنیک هایی از قبیل MLVA بیش از پیش بر همه محققین حوزه درمان آشکار شده است. به این دلیل در سالهای اخیر، تیپ بندی بر پایه MLVA که در آن جدایه ها توسط تعداد تکرار های آنها در چندین ناحیه ژنی بررسی می شوند برای

فاصله کلون ها به یکدیگر نزدیک تر می باشد (۱۵). الگوی MST معمولاً درک بهتری از تیپ بندی سویه هایی که عامل ایجاد یک صفت مشترک هستند را به ما می دهد. به این دلیل که همزمان تفاوت ها و شاخص های مشترک را بصورت کمپلکس کلنال مشخص می نماید (۱۶).

جدول ۳. تعیین تیپ سویه های سودوموناس آئروژینوزا. ۷۰ سویه انتخاب شده به ۳۹ تیپ دسته بندی شده اند که سویه ها بر اساس شباهت در تعداد تکرارها و قرابت آنها درون یک تیپ قرار گرفته اند

سویه ها	شماره تیپ بندی	سویه ها	شماره تیپ بندی
۳۱	۲۱	۲،۳،۹،۲۲،۴۴،۴۹،۵۰،۵۲،۸،۵۹	۱
۳۰	۲۲	۱۱،۱۳،۱۵،۱۹،۲۱	۲
۶۴	۲۳	۴۶،۵۳،۵۴	۳
۴۷	۲۴	۶،۱۰،۳۴	۴
۱۲	۲۵	۴،۱۴،۲۰	۵
۶۱	۲۶	۳۵،۳۶،۳۷،۳۹،۴۸	۶
۲۸	۲۷	۵،۷	۷
۲۳	۲۸	۲۵،۲۷	۸
۴۵	۲۹	۳۸،۵۶	۹
۱۶	۳۰	۲۴،۶۵	۱۰
۶۲	۳۱	۱۸،۶۳	۱۱
۴۳	۳۲	۴۱،۴۲	۱۲
۵۱	۳۳	۳۲،۳۳	۱۳
۶۰	۳۴	۶۶،۶۷	۱۴
۱۷	۳۵	۴۰	۱۵
۶۹	۳۶	۱	۱۶
۸	۳۷	۵۵	۱۷
۷۰	۳۸	۵۷	۱۸
۶۸	۳۹	۲۶	۱۹
-	-	۲۹	۲۰



شکل ۲. دیاگرام حاصل از نمودار تکاملی بدست آمده از توالی های تکراری پشت سر هم از سویه های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران دارای عفونت ادراری.

که برای آنالیز انتخاب شده بودند، اکثر سویه‌ها دارای لوکوس‌های فوق بودن و فقط فراوانی لوکوس MS-173 کمتر بود که در مطالعات سایر مناطق دنیا نیز چنین نتایجی مشاهده شده است (۹۱ و ۹۳). نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که لوکوس‌های مورد استفاده در این مطالعه قدرت تمایز بالایی داشتند. داده‌های ما انتشار کلونال ژنوتیپ‌های سودوموناس آئروژینوزا را در بیمارستان‌ها در بخش‌های مهمی همچون ICU نشان داد. شیوع بالای سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان‌های بررسی شده احتمالاً به عنوان یک نتیجه از انتقال یک سویه مشترک میان بیماران است به طوریکه انتشار کلونال دیده شد.

نتیجه مطالعه نشان داد که اکثر بیماران اعم از بیماران بستری شده در ICU و یا سرپایی در معرض عفونت ادراری می‌باشند، بطوریکه در این مطالعه از تمامی نمونه‌های بالینی تیپ‌های متفاوتی از سویه‌های بیمارستان‌شناسایی شد. علاوه بر این نتایج حاصل از تیپ‌بندی سویه‌ها بوسیله تکنیک جدید MLVA نشان داد که این روش می‌تواند علاوه بر صرف هزینه کمتر، با سرعت و دقت بیشتری در شناسایی منشأ سویه‌ها عمل کرده و این ارتباط بین منشأ سویه‌های جدا شده را نشان دهد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات عفونی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی ایران در اهدای نمونه بیماران و همکاری مشترک با پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری قدردانی می‌شود.

تعدادی از باکتری‌های مهم از جمله باسیلوس آنتراسیس، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فاسیوم، هموفیلوس آنفلوانزا، بوردتلا پرتوسیس و بسیاری دیگر استفاده شده است (۲۰). یکی دیگر از تکنیک‌های رایج که در مطالعات مختلف با MLVA مقایسه شده است تکنیک PFGE می‌باشد. Johansson و همکاران تعداد ۲۳۲ جدایه از سودوموناس آئروژینوزا را که از بیماران سیستمیک فایبروزیس جدا کرده بودند توسط هر دو روش ذکر شده آنالیز نمودند. در این مطالعه مقایسه‌ای ۹۱ درصد نتایج به یکدیگر شبیه بودند. با این وجود آنها به این مورد تاکید داشتند که علیرغم گران و زمان‌بر بودن PFGE دقت آن در مقایسه با MLVA بیشتر است (۱۲).

در یک مطالعه دیگر که توسط Lee و همکاران انجام شد، به این نتیجه رسیدند که برای آنالیز سویه‌های سودوموناس جدا شده از بیماران سیستمیک فایبروزیس که بصورت عفونت مزمن در آمده‌اند و باکتری‌های بیماری‌زا در ریه کلونیزه شده‌اند روش‌های مولکولی دقیق تری برای تمایز سویه باید بکار گرفته شود (۲۱). روش MLVA علیرغم اینکه نسبت به تکنیک‌هایی مانند PFGE از دقت کمتری برخوردار است ولی به این دلیل که در این روش هر سویه با یک کد توصیف می‌شود که با تعداد تکرارها در VNTR در ارتباط است، آنالیز تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها را به راحتی امکانپذیر می‌کند. در مطالعه حاضر نشان داده شد که بکارگیری تکنیک MLVA بخوبی می‌تواند با سرعت و دقت بالایی سویه‌ها را از یکدیگر تمایز دهد، بطوریکه هر ۷۰ سویه مورد مطالعه به کمک این تکنیک آنالیز شدند. در تحقیق حاضر از ۸ لوکوس (MS-213, MS-214, MS-215, MS-217, MS-22, MS223, MS142, MS-173)

Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for Typing *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Urine Samples of Different Patients

H.E. Lashgarian (PhD)¹, A. Marzban (PhD)², M. Estaji (MSc)³, M. Gholami (MSc)⁴,
H. Masoumi Asl (PhD)⁵, J. Raheb(PhD)^{3*}

1.Hepatitis Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, I.R.Iran.

2.Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, I.R.Iran.

3.Molecular Medicine Department, Medical Institute, National Institute of Genetics and Biotechnology, Tehran, I.R.Iran.

4.Department of Microbiology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, I.R.Iran.

5.Infectious Disease Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 20(2); Feb 2018; PP:56-63

Received: Jul 11th 2017, Revised: Oct 15th 2017, Accepted: Nov 29th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Pseudomonas aeruginosa* is considered as one of the important causes of urinary infections in hospitals. The aim of the current study is the genetic typing for the number of bacterial strains isolated from patients using MLVA technique.

METHODS: In this study, 70 isolates were collected from different hospitals located in Tehran city. First, DNA extraction was conducted for genotyping analysis by MLVA method. Subsequently, VNTR sequences located in several genes of bacterial genomes such as MS-214, MS-215, MS-217, MS-222, MS-223, MS-142 and MS-173 were amplified by specific primers using PCR technique. After confirming the PCR amplification using electrophoresis and visualization of their bands on agarose gel, relationship evolutionary graph for the different strains was constructed based on MLVA technique.

FINDINGS: After the electrophoresis of PCR products and determination of VNTR copy-numbers, 70 strains were classified as 39 types and genetic evolutionary tree was also constructed based on VNTRs Data. According to the MST algorithm, 70 clinical strains divided into 11 clonal complexes which these criteria is interpreted as genetic distance based on the difference of VNTR copy numbers for each group.

CONCLUSION: The present study showed that MLVA could be helpful for typing clinical strains of *P. aeruginosa*. The results also showed that this method had great potential to differentiate those strains with high phenotypic similarity.

KEY WORDS: *Pseudomonas Aeruginosa*, Genotyping, Urinary infection, MLVA, VNTR.

Please cite this article as follows:

Lashgarian HE, Marzban A, Estaji M, Gholami M, Masoumi Asl H, Raheb J. Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for Typing *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Urine Samples of Different Patients. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(2):56-63.

*Corresponding Author; J. Raheb(Phd)

Address: Department of Molecular Medicine, National Research Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R.Iran.

Tel: +98 21 8896 4792

E-mail: jam@nigeb.ac.ir

References

1. Moore NM, Flaws ML. Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Clin Lab Sci. 2011;24(1):43-6.
2. Ebrahimipour G, Moradi A, Karkhane M, Marzban A. Antibiotics and heavy metal resistance of three strains of *pseudomonas aeruginosa* isolated from different ecological areas. Med Lab J. 2015;8(4):55-60.
3. Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Ann Microbiol. 2011;61(4):717-32.
4. Karkhane M, Pourhoseingholi MA, Kimiia Z, Mortazavi SM, Torkabad MRA, Aghdam SKH, Marzban A, Zali MR. Attitudes toward nosocomial infections associated mortality at intensive care units, and evaluation of the risk factors. Arch Clin Infect Dis. 2016;11(2):e22504.
5. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):582-610.
6. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 international clinical practice guidelines from the infectious diseases society of america. Clin Infect Dis. 2010;50(5):625-63.
7. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infect Genet Evol. 2010;10(7):866-75.
8. Naze F, Jouen E, Randriamahazo R, Simac C, Laurent P, Blériot A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus. J Clin Microbiol. 2010;48(9):3146-52.
9. Vu-Thien H, Corbineaue 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(10):3175-83.
10. Dass SC, Abu-Ghannam N, Antony-Babu S, Cummins EJ. Ecology and molecular typing of *L. monocytogenes* in a processing plant for cold-smoked salmon in the Republic of Ireland. Food Res Int. 2010;43(5):1529-36.
11. Larsson J, Torpdahl M, Petersen R, Sørensen G, Lindsted B, Nielsen E. Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). Eurosurveillance (Online Edition). 2009;14(15).
12. 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 Cystic Fibrosis. 2015;14(3):353-60.
13. 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(11):4991-7.
14. 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(1):43-51.
15. Santos AS, Tilburg JJ, Botelho A, Barahona MJ, Nuncio MS, Nabuurs-Franssen MH, et al. Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing. Int J Med Microbiol. 2012;302(6):253-6.
16. Prendergast D, O'Grady D, Fanning S, Cormican M, Delappe N, Egan J, et al. Application of multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA), phage typing and antimicrobial susceptibility testing to subtype *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pig farms, pork slaughterhouses and meat producing plants in Ireland. Food Microbiol. 2011;28(5):1087-94.

17. Farrell D, Morrissey I, De Rubeis D, Robbins M, Felmingham D. A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. *J Infect.* 2003;46(2):94-100.
18. Glover M, Moreira CG, Sperandio V, Zimmern P. Recurrent urinary tract infections in healthy and nonpregnant women. *Urolog Sci.* 2014;25(1):1-8.
19. Leclercq SY, Sullivan MJ, Ipe DS, Smith JP, Cripps AW, Ulett GC. Pathogenesis of *Streptococcus* urinary tract infection depends on bacterial strain and β -hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation and virulence. *Sci Rep.* 2016;6.
20. 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(5):19668.
21. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2003;2(1):29-34.