مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره دوم (پیاپی ۳۱) تابستان ۱۳۹۶
صفحات ۱۱۳-۱۰۴

Original Article

تایپینگ مولکولی سویه های *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از عفونت های خون با روش ترادف یابی چند جایگاهی (MLST)

زهره محمدی[۱]، حسن ممتاز[۲*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، [۲] استاد، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: *اسینتوباکتر بامانی* یک کوکوباسیل گرم منفی است که در طبیعت انتشار وسیعی داشته و به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی محسوب می‌شود. مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی ژنتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از عفونت های خون به روش تایپینگ ترادف یابی چند جایگاهی (MLST) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، تعداد ۳۶ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* از عفونت‌های خونی بیماران بیمارستان های پیامبران و بقیه اله (عج) در تهران جداسازی شدند. سپس محصول PCR مربوط به تکثیر ۷ ژن خانه دار توالی یابی گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده از هر ژن در هر جدایه در بانک اطلاعاتی MLST آنالیز و علاوه بر تعیین آلل‌های هر ژن، کلون‌های مربوط به تمامی جدایه تعیین گردید.

یافته ها: در مجموع ۵ کلون ST25، ST136، ST307، ST327، ST328 در ۳۶ جدایه شناخته شد. ST مربوط به ۲ جدایه با اطلاعات مربوط در سایت MLST شناسایی نگردید. ST های تعیین شده در ۵ خوشه ژنتیکی A، B، C، D و E قرار گرفتند.

نتیجه گیری: شناسایی میزان قابل قبولی از تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌ها با استفاده از تکنیک MLST نشان می‌دهد که این روش در مطالعه و تایپینگ جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* روش مفیدی به حساب می‌آید. بنابراین، می‌توان جدایه‌های با منشاء متفاوت را در گروه‌های مختلف تقسیم بندی نمود.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر بامانی*، ژن‌های خانه دار، تایپینگ ترادف یابی چند جایگاهی، کلون‌های ژنتیکی، عفونت خون.

دریافت مقاله: مهرماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۵

مقدمه

اسینتوباکترها (*Acinetobacter*) باکتری‌های گرم منفی باسیلی یا کوکوباسیلی هستند که قدرت تخمیر ندارند. این باکتری‌ها نیازمندی‌های غذایی کمی برای رشد داشته و می‌توانند در شرایط نامساعد، سطوح خشک و همچنین محیط آبی به مدت طولانی زنده بمانند (۱ و ۲).

این باکتری به عنوان یکی از پاتوژن‌های مشکل ساز در بخش مراقبت‌های ویژه در سرتاسر جهان شناخته شده که به علت خاصیت بالینی قابل توجه آن به ویژه در سال‌های اخیر و توانایی آن در کسب مقاومت دارویی، به عنوان یکی از میکروارگانیسم های تهدید کننده مقاومت نسبت به درمان با داروهای ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شود (۲). عوامل خطرزای موثر در عفونت بیمارستانی مانند: مدت بستری در بیمارستان، جراحی، استقرار مدفوعی، زخم، درمان با آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف، تغذیه وریدی، کاتتر ورید مرکزی، کاتتر ادراری، تهویه مکانیکی، بستری شدن در بخش سوختگی و ICU می باشند.

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۴۵ پست الکترونیک: hamomtaz@iaushk.ac.ir

این باکتری‌ها عامل عفونت‌های مختلف بیمارستانی مانند باکتریمی، عفونت مجاری ادراری و مننژیت ثانویه می‌باشند. اما نقش برجسته آن ایجاد پنومونی بیمارستانی به ویژه پنومونی ایجاد شده در دستگاه تنفسی فوقانی بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت‌های ویژه می‌باشد (۳).

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتایپینگ، سروتایپینگ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تایپینگ و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به منظور تایپینگ و دسته بندی عوامل عفونی استفاده می‌شد. اما امروزه روش‌های مولکولی به دلیل اختصاصیت بیشتر، سرعت بالاتر و قابلیت تکرار پذیری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده اند. پالسفیلد ژل الکتروفورز (PFGE= Pulsed field gel electrophoresis) روش‌های مبتی بر برش آنزیمی و آنالیز پلاسمیدی، ریبوتایپینگ، روش‌های مبتنی بر PCR (Polymerase chain reaction) مانند RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR)، EP-PCR (Repetitive Element Palindromic PCR)، ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence-based PCR) از روش‌های مولکولی متداول در تایپینگ عوامل عفونی از جمله *اسینتوباکتر بامانی* می‌باشند (٤). اخیراً روش‌های جدید مولکولی نظیر تایپینگ ترادف یابی چند جایگاهی (Multilocus sequence = MLST typing) که اساس آن بررسی تفاوت آللی در توالی نوکلئوتیدی ژن‌های خانه دار (House Keeping Genes) می‌باشد، کاربرد فراوانی در بررسی روابط خویشاوندی و ژنتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* پیدا کرده است (۵).

ژن‌های خانه دار شامل ساختاری هستند که در بیشتر یا تمام سلول‌ها بیان می‌شوند و سلول‌ها برای انجام اعمال متابولیکی خود به آن‌ها نیاز دارند. با توجه به این که هر یک از این ژن‌ها توالی‌های متفاوتی در داخل یک سویه باکتریایی به عنوان آلل متمایز کننده اختصاصی وجود دارند، بنابراین وجود آلل‌های متفاوت از ژن‌های خانه دار در میان جدایه‌های یک سروتیپ و در نتیجه الگوهای متفاوت تایپینگ می‌تواند در بررسی ارتباط کلونال جدایه‌های مورد بررسی بسیار حائز اهمیت باشد (۵).

مطالعات محدودی در ایران با به کارگیری روش MLST انجام شده است. در پژوهش هژبری (Hojabri) و همکاران (۲۰۱٤) بر روی اپیدمیولوژی مولکولی جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* در ایران ۱۲ کلون مختلف، شامل شش گونه جدید شناسایی شد (٦). فرشادزاده (Farshadzadeh) و همکاران (۲۰۱۵)، ٤۰ کلون مختلف را در قالب ٤ کمپلکس کلونال (CC) شناسایی نمودند (۷). *اسینتوباکتر بامانی* دارای هفت ژن خانه دار *gltA* (Citrate Synthase)، *gyrB* (DNA gyrase subunit B)، *gdhB* (Glucose dehydrogenase B)، *recA* (Homologous recombination factor)، *cpn60* (chaperonin 60 KDa)، *rpoD* (RNA polymerase sigma factor) و *gpi* (Glucose-6-phosphate isomerase) می باشد.

در روش MLST از توالی یابی این ژن ها به منظور تعیین آلل های مختلف ژن های خانه دار و شناسایی کلون های ژنتیکی (ST=Sequence Types) در جدایه های مورد مطالعه استفاده می گردد (۸). هدف از این مطالعه، تعیین کلون های ژنتیکی در جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از عفونت‌های خونی در بیماران بستری در ۲ بیمارستان شهر تهران بود.

مواد و روش ها

الف) جدایه‌های باکتریی: تعداد ۳٦ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* جداشده در مطالعات قبلی از عفونت‌های خون در دو بیمارستان پیامبران و بقیه اله (عج) شهر تهران انتخاب گردید (۹). این جدایه‌ها در محیط کشت لوریا برتانی (LB) (مرک، آلمان) حاوی ۳۰٪ گلیسرین در دمای ۷۰- درجه سلسیوس به شکل گلیسرینه نگهداری شده بودند. به منظور بازیابی جدایه‌ها، نمونه‌های گلیسرینه به مدت ٢٤ ساعت در محیط مایع لوریا برتانی کشت داده شدند. پس از یک نوبت کشت مجدد در این محیط، برای انجام آزمایش‌های مورد نظر انتخاب شدند.

ب) استخراج DNA: DNA ژنومی از باکتری‌های رشد یافته در محیط لوریا برتانی با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت فرمنتاس-لیتوانی (Genomic DNA Purification) مطابق با دستور العمل شرکت سازنده

استخراج و در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند.

ج) تائید مولکولی: به منظور تائید قطعی *اسینتوباکتر بامانی* در جدایه‌های مورد مطالعه از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی ناحیه 16S-23S rDNA با توالی F: 5'-CATTATCACGGTAATTAGTG-3' و R: 5'-AGAGCACTGTGCACTTAAG-3' استفاده شد (۱۰). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR (X10)، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم، ۱ میکرولیتر dNTPs Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (سیناژن، ایران)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (فرمنتاس-لیتوانی) و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر SensQuest (آلمان) با شرایط دمایی ٦ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۷ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۸ دقیقه انجام شد (۱۰).

د) آزمایش MLST: از این روش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از عفونت‌های خونی مطابق با دستورالعمل توصیه شده در سایت http://pubmlst.org/abaumannii/ استفاده شد (۸). در روش MLST توالی نوکلئوتیدی مربوط به ۷ ژن خانه دار *اسینتوباکتر بامانی* پس از تکثیر در روش PCR، تعیین توالی شده و توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده برای ۷ ژن مربوط به هر جدایه با توالی‌های قبلی ثبت شده در این سایت مقایسه شد. ضمن تعیین شماره آلل‌های مربوط به هر ژن، ST مربوط به هر جدایه تعیین گردید. برای انجام این روش از پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱، انتخاب شده از سایت رسمی MLST استفاده گردید (۸). تکثیر هر کدام از ژن‌های یاد شده به صورت جداگانه با استفاده از روش PCR معمولی انجام گرفت. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR (X10)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTPs mix، ۰/۵ میکرولیتر از جفت پرایمرهای F و R مربوط به هر ژن، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه انجام شد. واکنش PCR جهت تکثیر ژن‌های خانه دار با شرایط دمایی ٦ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۸). محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید و با دستگاه UVitech (انگلستان) از ژل حاصل تصویربرداری و ثبت گردید. محصول PCR مربوط به هر ژن از هر جدایه (مجموعاً ۲۵۲ محصول PCR) با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (PCR Clean up-vivantis, Malaysia) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ۷ ژن خانه دار *اسینتوباکتر بامانی*.

نام ژن	توالی پرایمر (5' ---- 3')	اندازه محصول (جفت باز)
gltA	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G	۷۲۲
gyrB	TGA AGG CGG CTT ATC TGA GT GCT GGG TCT TTT TCC TGA CA	۵۹٤
gdhB	GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C	۷۷٤
recA	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	٤۲۵
cpn60	GGT GCT CAA CTT GTT CGT GA CAC CGA AAC CAG GAG CTT TA	٦٤۰
gpi	GAA ATT TCC GGA GCT CAC AA TCA GGA GCA ATA CCC CAC TC	٤٦۵
rpoD	ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT	٦۷۲

نمونه‌های تخلیص شده به منظور تعیین توالی ژن‌های تکثیر یافته در هرجدایه به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و با استفاده از دستگاه ABI 3730 XL و روش Sanger Sequencing تعیین توالی گردید.

ه) تعیین شماره آلل‌های ژن‌های خانه دار: توالی نوکلئوتیدی مربوط به هر ژن خانه دار توسط نرم افزار Chromas مورد بررسی و اصلاح قرار گرفت. در قسمت آنالیز داده ها (analysis data) سایت MLST گزینه Download allele انتخاب و توالی مورد نظر با توالی آلل‌های ثبت شده در سایت مقایسه و اصلاحات لازم انجام گرفت. برای تعیین شماره آلل‌ها، توالی‌های اصلاح شده در قسمت Locus Query بخش Single Locus وارد و شماره آلل‌های مربوط به هر ژن تعیین گردید (۸).

و) تعیین کلون‌ها (Sequence types=STs): پس از تعیین شماره آلل‌های مربوط به هر ژن، شماره آلل‌های مربوط به ۷ ژن خانه دار *اسینتوباکتر بامانی* یعنی ژن‌های *gltA*، *gyrB*، *gdhB*، *recA*، *cpn60*، *gpi*، *rpoD* در قسمت Profile QueryAllelic سایت وارد و ST مربوط به هر جدایه تعیین گردید (۸).

ز) بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها: ارتباط فیلوژنی بین ۳۶ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* مورد مطالعه که توالی نوکلئوتیدی مربوط به ۷ ژن خانه‌دار در آن‌ها تعیین شده بود توسط الگوریتم eBURST (v.3) در سایت http://eburst.mlst.net بررسی گردید (۸).

یافته ها

در مطالعه حاضر ۳۶ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از عفونت‌های خونی جدا شده در مطالعه قبلی از بیماران مبتلا به باکتریمی (عفونت خون) در دو بیمارستان پیامبران و بقیه اله (عج) شهر تهران انتخاب گردید (۱۱). توالی نوکلئوتیدی مربوط به ۷ ژن خانه‌دار در یکی از جدایه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. در ۳۶ جدایه *اسینتوباکتربامانی* مورد بررسی ۵ پروفایل (کلون =ST) ژنتیکی شامل ST307، ST136، ST328، ST25، ST327 شناسایی شد و ST مربوط به ۲ جدایه با اطلاعات موجود در سایت MLST مطابقت نداشت که به عنوان جدایه‌های غیرقابل تیپ بندی معرفی شدند. فراوانی ST های شناخته شده در ۳۶ جدایه مورد بررسی در جدول ۳ آورده شده است. همان گونه که در این جدول مشاهده می شود، کلون ST307 با فراوانی ۳۳/۳۳ درصد غالب‌ترین پروفایل شناخته شده در ۳۶ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* مورد مطالعه می‌باشد.

در قسمت دیگر از این تحقیق الگوی آلل‌های مختلف ژن‌های خانه دار در *اسینتوباکتر بامانی* یعنی ژن‌های *gltA*، *gyrB*، *gdhB*، *recA*، *cpn60*، *gpi*، *rpoD* در ST های شناخته شده در این مطالعه تعیین شد. شماره آلل‌ها در انواع ST های شناخته شده در جدول ٤ آورده شده است.

ارتباط فیلوژنی بین جدایه‌ها توسط الگوریتم eBURSTv3 بررسی شد. بر اساس الگوی سکانس تایپ به دست آمده با استفاده از نرم افزار GelClust و روش ماتریکس فاصله طبق مدل UPGMA، داده‌ها آنالیز و دندروگرام الگوی کلاسترینگ به دست آمده از مجموع انواع ST ترسیم گردید. از بین ۳٦ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* مورد مطالعه، ۳٤ جدایه تعیین تیپ شدند و ST آن‌ها با ST های ثبت شده در بانک اطلاعاتی سایت MLST مطابقت داشت. این ۳٤ جدایه در ۵ کلاستر از A تا E قرار گرفتند که در نمودار ۱ الگوی دندروگرام این جدایه‌ها ترسیم شده است.

بحث

در سال‌های اخیر، بررسی ارتباط ژنتیکی در میان پاتوژن‌های میکروبی امری ضروری شده چرا که تعیین منشاء اپیدمیولوژیک میکروب و عفونت به طراحی روش‌های کنترل پاتوژن کمک شایانی می‌کند. نقش تایپینگ عوامل پاتوژن میکروبی در مشخص کردن ارتباط ژنتیکی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی یا محیطی می‌باشد.

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتایپینگ، سروتایپینگ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تایپینگ و پروفایل حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک‌ها، جهت دسته بندی باکتری‌ها استفاده می‌شد.

ولی امروزه پیشرفت روش‌های مولکولی در دو دهه اخیر، این روش‌ها را در تایپینگ مولکولی باکتری‌ها بسیار کارآمد کرده است. روش‌های مولکولی که برای تایپینگ باکتری‌ها به کار می‌روند عبارتند از PFGE، روش‌های متکی بر برش آنزیمی،

جدول ۲: توالی نوکلئوتیدی مربوط به ۷ ژن خانه دار در یکی از جدایه های *اسینتوباکتر بامانی*.

gltA	GATCCTGGTTTTATGGCGACAGCTTCATGCGAGTCTAAAATCACATTTATCGATGGTGAC AAAGGTATTTTATTACACCGCGGTTACCCGATTGACCAGTTAGCGACTCAAGCAGACTAC CTTGAAACTTGTTATTTATTATTAAATGGCGAGTTACCAACTGCTGAACAAAAAGTTGAG TTCGATGCGAAAGTTCGTGCTCATACTATGGTTCATGATCAAGTTAGCCGTTTCTTCAAT GGTTTCCGTCGTGATGCTCACCCTATGGCAATCATGGTTGGTGTAGTAGGCGCATTATCT GCTTTCTATCACAACAACCTTGACATTGAAGACATCAATCACCGCGAAATTACTGCGATT CGTTTGATTGCTAAAATTCCAACGCTTGCTGCTTGGAGCTACAAATATACTGTAGGTCAG CCATTCATCTATCCACGTAATGACTTAAATTATGCGGAAAACTTCTTACACATGATGTTT GCA
cpn60	ATGAACCCAATGGATTTAAAACGCGGTATCGACATTGCAGTAAAAACTGTAGTTGAAAAT ATCCGTTCTATTGCTAAACCAGCTGATGATTTCAAAGCAATTGAACAAGTAGGTTCAATC TCTGCTAACTCTGATACTACTGTTGGTAAACTTATTGCTCAAGCAATGGAAAAAGTAGGT AAAGAAGGCGTAATCACTGTAGAAGAAGGTTCTGGCTTCGAAGACGCATTAGACGTTGTA GAAGGTATGCAGTTTGACCGTGGTTATATCTCTCCGTACTTTGCAAACAAACAAGATACT TTAACTGCTGAACTTGAAAATCCGTTCATTCTTCTTGTTGATAAAAAAATCAGCAACATT CGTGAATTGATTTCTGTTTTAGAAGCAGTTGCTAAAACTGGTAAA
fusA	ATTGGTGAAGTACACGACGGTGCAGCAACAATGGACTGGATGGAACAAGAGCAAGAGCGT GGTATTACAATTACCTCTGCTGCAACAACTTGTTTCTGGTCTGGTATGGGTAACCAATTC CCACAACACCGTATCAACGTAATTGATACACCGGGACACGTTGACTTCACAATCGAAGTT GAGCGTTCTATGCGTGTTCTTGACGGTGCTTGCATGGTTTACTGTGCAGTTGGTGGTGTA CAGCCTCAGTCTGAAACTGTATGGCGTCAGGCTAACAAATATAAAGTGCCTCGTTTAGCA TTCGTGAACAAGATGGACCGTACTGGTGCAAACTTCTTCCGTGTTGTTGAACAAATGAAA ACACGTCTTGGTGCGAATCCTGTGCCAATCGTTGTGCCAATCGGTGCTGAAGACACATTC ACTGGTGTAGTTGACCTTATCGAAATGAAGGCAATTATCTGGGATGAAGCTTCTCAAGGT ATGAAGTTTGAATACGGCGAGATTCCAGCTGACCTAGTTGATACTGCTCAAGAATGGCGT ACAAACATGGTTGAAGCTGCTGCTGAAGCTTCTGAAGAGTTAATGGACAAGTACCTTGAA GAGGGTGATCTTTCTAAAGAAGACATCATCGCA
pyrG	AAAGTCACAATGGTTAAAATGGATCCTTATATTAATGTCGATCCAGGGACAATGAGCCCA TTCCAGCATGGTGAAGTTTTTGTTACCGAAGATGGTGCAGAAACAGATCTGGATCTGGGT TATTACGAACGTTTCTTACGTCGCGCGAAAATGACCAAACTAAACAACTTCACTAGTGGT CGTGTATATCAAGACGTTTTAAATAAAGAGCGTCGTGGTGATTACTTAGGTGGTACAGTT CAGGTTATTCCTCATATTACCGACAATATTAAAGAACGTGTACTCCGCGCAGGCGAA
recA	TTACAAGCAATTGCTCAATGTCAAAAATCTGGTGGTACATGTGCCTTCATTGATGCTGAG CACGCCCTAGACCCTCAATATGCACGCAAACTTGGTGTAGATATTGATAACCTACTTGTT TCACAACCCGACAATGGTGAGCAAGCACTTGAAATTGCTGACATGCTTGTCCGTTCAGGC GCAATTGATTTAATCGTTGTGGACTCGGTGGCTGCACTTACGCCTAAAGCAGAAATCGAA GGTGAGATGGGTGACTCTCATATGGGTCTACAAGCGCGTCTTATGAGCCAGGCACTTCGT AAAATTACGGGTAATGCTAAACGTTCAAACTGTATGGTTATCTTCATTAACCAGATTCGT ATGAAAATTGGT
rplB	CGTCGTTATATCATTGCGCCTAAAGGCTTACGTGCTGGTGATAAAGTACAATCTGGTAAC GATGCTCCAATTCGTCCAGGTAACTGTTTACCACTTCGTAACATGCCAATCGGTTCTACA CTTCATAACGTTGAACTTAAAATCGGTAAAGGTGCTCAATTAGCACGTTCTGCTGGTGCT TCTGTTCAATTGTTGGGTCGTGATGGTTCTTACGCAATCATTCGTCTTCGTTCAGGCGAA ATGCGTAAAGTACACGTTGAATGCCGCGCTGTAATTGGTGAAGTTTCTAACCAAGAAAAC AACCTTCGCTCATTAGGTAAAGCTGGTGCT
rpoB	CAAACTCACTATGGTCGTGTTTGTCCAATTGAAACTCCTGAAGGTCCAAACATTGGTTTG ATCAACTCGCTTTCTGTATACGCAAAAGCGAATGACTTCGGTTTCTTGGAAACTCCATAC CGCAAAGTTGTAGATGGTCGTGTAACTGATGATGTTGAATATTTATCTGCAATTGAAGAA GTAGGCACTGTTATTGCACAGGCCGACTCTGCAGTAGATAAAGATGGCAACTTAACAGAA GAATTCGTTTCTGTTCGTCATCAAGGTGAATTCGTACGTATGCCGCCTGAAAAAGTAACG CATATGGACGTTTCTGCACAGCAGGTAGTATCTGTTGCTGCATCACTTATTCCATTCCTT GAACACGATGACGCAAACCGTGCGCTCATGGGTTCAAACATGCAACGTCAGGCAGTTCCT ACTTTACGTGCGGATAAACCGCTTGTAGGTACAGGT

جدول ۳: کلون های ژنتیکی غالب شناخته شده در ۳۶ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از موارد باکتریمی.

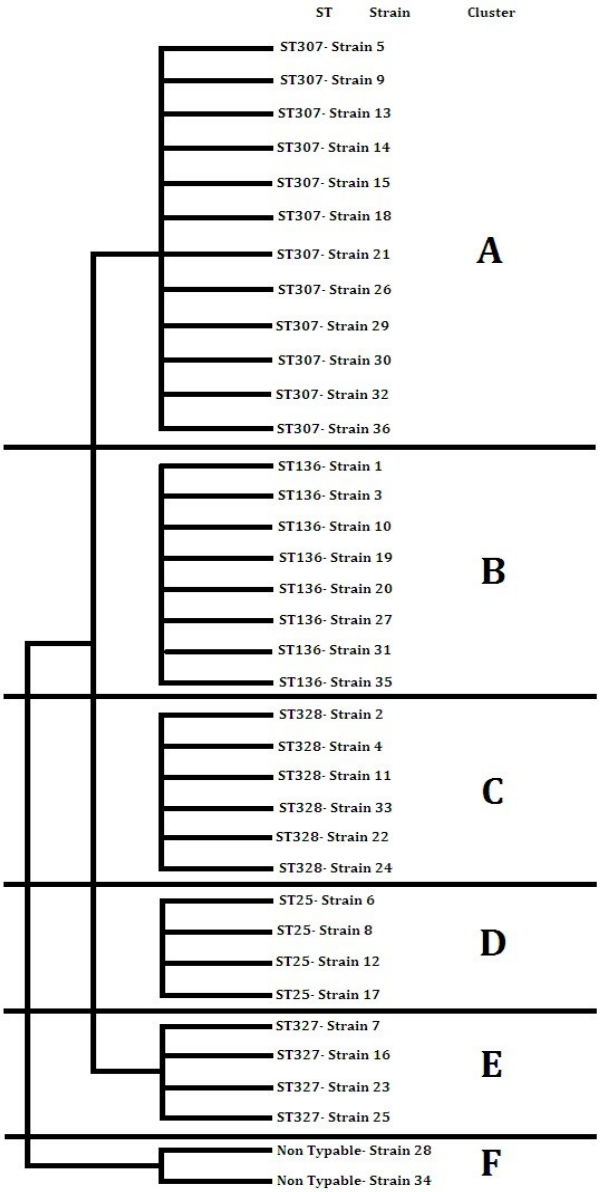
کلون ST	تعداد جدایه	فراوانی (درصد)
ST307	۱۲	۳۳/۳۳
ST136	۸	۲۲/۲۲
ST328	٦	۱٦/٦٦
ST25	٤	۱۱/۱۱
ST327	٤	۱۱/۱۱
Non ST-typeable	۲	۵/۵۵

جدول ٤: شماره الل های مربوط به ۷ ژن خانه دار در STهای شناخته شده در جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده از موارد باکتریمی.

ST	*gltA*	*gyrB*	*gdhB*	*recA*	*cpn60*	*gpi*	*rpoD*
ST25	۱	۱	٤۱	٦	۲۳	۳۱	۲٦
ST136	۱	۳	۳	۲	۲	۱٦	۳
ST307	۳	۷۷	٤۲	۱۱	۱٦	۹	۵
ST327	۲۷	٦۵	۹۹	۳۳	۲۵	۵٦	٦۰
ST328	۲۷	٦۵	۹۹	۵۵	۲۵	۱۲۰	٦۰

آنالیز پلاسمیدها و تیپ بندی بر اساس واکنش‌های مختلف PCR. به کارگیری روش‌های مولکولی برای تیپ بندی پاتوژن‌ها در ارتباط دهی دقیق بین سویه‌ها و گونه‌ها بسیار اساسی می‌باشد.

اثبات ارتباطات کلون‌های مختلف یک پاتوژن امکان شناسایی منبع آلودگی (انسان یا محیط) و همچنین تمایز بین سویه‌های عفونی را از غیر عفونی را فراهم می آورد (۱۵-۱۲). یکی از جدیدترین روش‌های مولکولی تایپینگ باکتری‌ها که مبتنی بر



نمودار ۱: دندروگرام جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* بر اساس انواع ST- تعیین شده.

تکثیر ژن‌های بیماری‌زا و ژن‌های ضروری میزبان است، روش تایپینگ بر اساس سکانس چند ناحیه‌ای (MLST) است. MLST روشی با قدرت تمایز بسیار بالا است که بر اساس آنالیز پلی مورفیسم‌های نوکلئوتیدی در توالی‌های ۷ قطعه داخلی ۵۰۰-۴۰۰ جفت بازی از ژن‌های (لوکوس) مولد آنزیم‌های ضروری برای سلول مبتنی بر واکنش PCR و توالی یابی ژنی است. توالی‌های بدست آمده از هر لوکوس ژنی در یک گونه باکتریایی به عنوان یک آلل شناخته می‌شود و آلل‌های به دست آمده در هر لوکوس را در مجموع یک پروفایل آللی یا یک sequence type می‌نامند.

بنابراین هر جدایه از یک گونه با یک سری شماره‌های آللی در لوکوس‌های مختلف یا با یک عدد واحد به نام ST شناسایی می‌شود. از آنجایی که MLST یک روش متکی بر توالی‌های نوکلئوتیدی است و تکنولوژی وابسته به آن به طور قابل ملاحظه‌ای از نظر بازدهی و قابل اعتماد بودن در دو دهه گذشته پیشرفت کرده است، بنابراین یک روش با قابلیت تکرارپذیری بالا و مزایای زیاد از نظر تولید داده‌های استاندارد می‌باشد.

این روش تبادل داده‌های حاصل از تایپینگ مولکولی بین آزمایشگاه‌ها را از طریق اینترنت به آسانی امکان پذیر ساخته و باعث توسعه مطالعات اپیدمیولوژیکی در سطح جهان شده است. در این خصوص، پایگاه داده‌ها از طریق اینترنت برای چند ارگانیسم در پایگاه داده ها (www.mlst.net) قابل دسترس است و این اجازه را می‌دهد تا نتایج تایپینگ به صورت یکپارچه در آمده و مدیریت گردد (۱۹-۱۶).

عفونت‌های ناشی از اعضای جنس *اسینتوباکتر* به یکی از مشکلات عمده مراکز درمانی تبدیل شده است. سالانه شیوع‌های ناگهانی متعددی از این باکتری، از بیمارستان‌های سراسر جهان گزارش می‌گردد که نشان دهنده اهمیت این باکتری و نیاز به یک برنامه‌ریزی مناسب جهت جلوگیری از ایجاد عفونت به ویژه توسط سویه‌های مقاوم می‌باشد (۲۰).

در انتخاب روش یا روش‌های تیپ بندی باید قدرت تفکیک، تکرار پذیری، سادگی روش، وسعت کاربرد، سرعت انجام و سادگی تفسیر داده‌ها را توجه نمود. روش‌های مولکولی جدید

بر خلاف روش‌های فنوتیپی که مبتنی بر بررسی ویژگی‌های ظاهری و تغییر پذیر می‌باشند، بر بررسی ترادف تغییرناپذیر یا کمتر تغییرپذیر ژنی میکروارگانیسم هدف، استوار است و کمتر تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. این روش‌ها نسبت به روش‌های سنتی واجد قدرت افتراق دهی بالاتر، کاربرد گسترده‌تر برای انواع مختلف گونه‌های میکروبی و سرعت بالاتر می‌باشند (۱۳، ۱٤ و ۲۱).

یکی از روش‌های دقیق تایپینگ باکتری‌ها از جمله *اسینتوباکتر بامانی* و تعیین ارتباط کلونال بین سویه‌های مختلف آن روش MLST است. در مطالعه حاضر نیز از همین روش در دسته بندی ژنتیکی ۳٦ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از موارد باکتریمی استفاده شد. مطالعات محدودی در خصوص به کارگیری این روش خصوصاً در کشور ما وجود دارد و عمده مطالعات به بررسی مقاومت ضد میکروبی این ارگانیسم اختصاص یافته است.

در پژوهش هژبری (Hojabri) و همکاران (۲۰۱٤)، بر روی اپیدمیولوژی مولکولی جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* در ایران ۱۲ کلون مختلف، شامل ٦ گونه جدید شناسایی شد (٦). در مطالعه‌ای در هند (۲۰۱۳)، روش MLST جهت تعیین الگوی ژنتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتربامانی* جدا شده از عفونت‌های بالینی به کار گرفته شده در این مطالعه ۱۲ کلون (ST) مختلف در ۲۳ جدایه مورد بررسی، شامل ST11 (۲ جدایه)، ST188 (۳ جدایه)، جدایه ST146 (۲ جدایه)، ST69 (۲ جدایه)، ST103 (۱ جدایه)، ST108 (۱ جدایه)، ST194 (۱ جدایه) شناسایی شد (۲۲).

در مطالعه هموداHamouda) و همکاران (۲۰۱۰)، در انگلستان، الگوی ژنتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتربامانی* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی با سه روش MLST، PFGE و تعیین توالی ژن *blaoxA-51-like* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۲٤ الگوی ST شناسایی شد که دارای سه الگوی مختلف از نظر حضور ژن *blaoxA-51* بودند (۲۳).

در مطالعه کارلوسکی (Karlowsky) و همکاران (۲۰۰۸)، الگوی ژنتیکی ۵۳ جدایه *اسینتوباکتربامانی* جدا شده از اپیدمی‌های بین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰٤ در اروپا وآمریکا به روش MLST مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۵۰ کلون (ST) مختلف شناسایی شد و ارتباط معنی‌داری بین نتایج MLST با PFGE و RAPD-PCR گزارش گردید (۲٤).

در مطالعه انجام شده ۵ کلون ژنتیکی مختلف شامل ST328، ST327، ST307، ST136 و ST25 در جدایه‌های مورد مطالعه شناسایی شد که در بررسی ارتباط فیلوژنی در ۵ کلاستر از A-E قرار گرفتند. کلون های شناخته شده در این مطالعه دقیقاً منطبق با مطالعه هژبریی و همکاران بود. به طوری که در مطالعه هژبری و همکاران نیز همین کلون ها به همراه ۷ کلون ST2, ST85, ST94, ST323, ST324 ST325, ST326 در جدایه های ایران ردیابی شد (٦).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سویه‌های در گردش *اسینتوباکتر بامانی* در بیمارستان‌های مورد مطالعه در شهر تهران با دارا بودن انواع ST متفاوت و قرار گرفتن در ۵ خوشه ژنتیکی از گوناگونی ژنتیکی بالایی برخوردار هستند. این چنین الگویی با انتظاری که از تنوع عفونت‌های خونی (مانند باکتریمی عفونت‌های مختلف دستگاه‌های بدن مانند دستگاه تنفسی، ادراری، آب‌های چرکی و...) وجود دارد، هم خوانی دارد. بنابراین احتمالاً سویه‌های مختلفی از *اسینتوباکتر بامانی* در ایجاد این عفونت‌ها و بالطبع عفونت خون دخالت دارند.

نتایج تحقیقات مشابه در زمینه اپیدمیولوژی عفونت‌های *اسینتوباکتر* با استفاده از روش MLST، اثبات کننده تکامل این پاتوژن و همچنین انتقال آلودگی آن از فردی به فرد دیگر دارد. از این رو استفاده از این روش می‌تواند به عنوان یک روش قابل قبول در کنترل عفونت‌های بیمارستانی محسوب گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Rasti A, Erfani Y, Yazdanbod H. Prevalence & antibiotic susceptibility of isolated Acinetobacters from blood culture in Shariati hospital. Payavard. 2010; 3(3-4): 70-75. [In Persian]

2. Ardebili A, Azimi L, Mohammadi-Barzelighi H, Owlia P, Beheshti M, Talebi M, Jabari M, Rastegar Lari AA. Determination of resistance pattern of isolated *Acinetobacter baumannii* from hospitalized burned patients in Motahari hospital, Tehran. Zanjan Univ Med Sci J. 2012; 20(83): 112-119. [In Persian]

3. Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of non-*Acinetobacter* baumannii species. Front Microbiol. 2016; 7: 49.

4. Nasonova ES. Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and applications. Tsitologiia. 2008; 50(11): 927-935.

5. Higgins PG, Janssen K, Fresen MM, Wisplinghoff H, Seifert H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2012; 50(11): 3493-3500.

6. Hojabri Z, Pajand O, Bonura C, Aleo A, Giammanco A, Mammina C. Moleclar epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Iran: endemic and epidemic spread of multi-resistant isolates. J Antimicrob Chemother. 2014; 69(9): 2383-2387.

7. Farshadzadeh Z, Hashemi FB, Rahimi S, Pourakbari B, Esmaeili D, Haghighi MA, Majidpour A, Shojaa S, Rahmani M, Gharesi S, Aziemzadeh M, Bahador A. Wide distribution of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in burns patients in Iran. Front Microbiol. 2015; 6: 1146.

8. http://pubmlst.org/abaumannii/

9. Momtaz H, Khamesipour F, Tavakol M, Awosile B. Determination of antimicrobial resistance and resistant genes in *Acinetobacter baumannii* from human clinical samples. West Indian Med J. 2015; DOI: 10.7727/wimj.2014.337.

10. Chiang MC, Kuo SC, Chen YC, Lee YT, Chen TL, Fung CP. Polymerase chain reaction assay forthe detection of *Acinetobacter baumannii* in endotracheal aspirates frompatients in the intensive care unit. J Microbiol Immunol Infect. 2011; 44(2): 106-110.

11. Tavakol M, Momtaz H. Detection of the most prevalent antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospital infections and determination of their antibiotic resistance pattern. Biol J Microorganism. 2015; 4(14): 71-82. [In Persian]

12. Foley SL, Lynne AM, Nayak. Moleclar typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect Genet Evol. 2009; 9(4): 430-440.

13. Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. Rev Infect Dis. 1986; 8(5): 682-692.

14. Loeb M. Host genomics in infectious diseases. Infect Chemother. 2013; 45(3): 253-259.

15. Stepan RM, Sherwood JS, Petermann SR, Logue CM. Molecular and comparative analysis of

Salmonella enterica Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. BMC Microbiol. 2011; 11: 153.

16. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 2003; 11(10): 479-487.

17. Cooper JE, Feil EJ. Multilocus sequence typing--what is resolved? Trends Microbiol. 2004; 12 (8): 373-377.

18. Almeida LA, Araujo R. Highlights on molecular identification of closely related species. Infect Genet Evol. 2013; 13: 67-75.

19. Shi C, Singh P, Ranieri ML, Wiedmann M, Moreno Switt AI. Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. Crit Rev Microbiol. 2015; 41(3): 309-325.

20. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(3): 538-582.

21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select &interpret molecular strain typing method for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular typing working group of the society for healthcare epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997; 18(6): 426-439.

22. Rynga D, Shariff M, Deb M. Multi locus sequence types of *Acinetobacter baumanii* clinical isolates from India. J Infect Dev Ctries. 2013; 7(4): 358-360.

23. Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla(OXA-51-like) genes. J Clin Microbiol. 2010; 48(7): 2476-2483.

24. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(5):1681-1688.

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 2, June 2017

Original Article

Molecular typing of the *Acinetobacter baumannii* strains isolated from blood infections using Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Zohreh Mohammadi[1], Hassan Momtaz[2]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2] Professor, Department of Microbiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Acinetobacter baumannii* is a Gram-negative coccobacillus that is widely distributed in nature and considered as one of the important causes of hospital infections. The present study was conducted to genotype *Acinetobacter baumannii* strains isolated from blood infections using Multi Locus Sequence Typing (MLST) method.

Materials & Methods: A total of 36 *Acinetobacter baumannii* strains were isolated from blood infection samples collected from Baqiatalah and Payambaran hospitals, Tehran, Iran. The PCR products obtained from amplification of seven housekeeping genes were sequenced. The nucleotide sequences of each gene in each isolate were queried against the reference sequence in the MLST database. In addition to characterization of the alleles specific to each gene, the sequence types (ST) of all isolates were determined.

Results: A total of 5 clones including ST25, ST136, ST307, ST327, and ST328 were identified in 36 isolates. ST of 2 isolates were not identified in MLST database. The identified STs were placed into 5 genetic clusters including A, B, C, D, and E.

Conclusion: Identifying an acceptable level of genetic diversity among the isolates using MLST technique shows that this method is useful for studying and typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. Therefore, it is possible to cluster isolates with diverse origins in different groups.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Housekeeping genes, Multi Locus Sequence Typing, Genetic clones, Blood infection.

Correspondence to: Hassan Momtaz

Tel: +98 3833361045

E-mail: hamomtaz@iaushk.ac.ir

Journal of Microbial World 2017, 10(2): 104-113.