ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از گوشت خام دام و طیور به روش تایپینگ ترادف‌یابی چندجایگاهی (MLST)

مرضیه توکل[۱]، حسن ممتاز[۱*]، پرویز مهاجری [۲،۱]، لیلی شکوهی زاده[۳،۱]، الهه تاجبخش[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *hamomtaz@iaushk.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۴

چکیده

سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* با مقاومت چندداروییِ عمدتاً به عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و نیز به عنوان یک آلوده‌کننده در حال ظهور در مواد غذایی با منشاء دامی محسوب می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژنوتایپینگ ایزوله‌های این باکتری در گوشت خام دام و طیور انجام شد. ۲۲ ایزوله جدا شده از انواع گوشت خام خوراکی با روش تایپینگ ترادف‌یابی چندجایگاهی و انتشار ساده دیسک آزمایش شدند. بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به تتراسیکلین با فراوانی ۹۰/۹۰ درصد و کمترین میزان مربوط به دو آنتی‌بیوتیک آزیترومایسین و ایمی‌پنم با ۹/۰۹ درصد بود. در ۲۲ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* مورد بررسی ۵ پروفایل (کلون=ST) ژنتیکی شامل ST15، ST10، ST12، ST25 وST25 شناسایی شد و ۵ ایزوله به عنوان ایزوله‌های غیر قابل تیپ‌بندی معرفی شدند. شناسایی میزان قابل قبولی از تنوع ژنتیکی در بین ایزوله‌ها با استفاده از تکنیک MLST نشان می‌دهد که این روش در مطالعه و تایپینگ ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* روش مفیدی به حساب می‌آید و می‌توان ایزوله‌های با منشاء متفاوت را در گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی نمود. در این مطالعه مشخص گردید که با استفاده از توالی‌یابی ژن‌های خانه‌دار می‌توان سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* را تایپ‌بندی نمود و این مقدار پلی‌مورفیسم نشان می‌دهد که این تکنیک روش مفیدی برای آنالیز تنوع ژنتیکی سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* در نمونه‌های غذایی با منشاء دامی می‌باشد.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتربومانی*، گوشت خام، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، روش تایپینگ ترادف‌یابی چندجایگاهی.

مقدمه

جنس *اسینتوباکتر* (*Acinetobacter*) واجد گونه‌های متعددی از کوکوباسیل‌های گرم‌منفی است که معمولا در آب، خاک، گیاهان، مدفوع، ادرار و پوست انسان و حیوانات یافت می‌شود (Peleg et al., 2008 Turton et al., 2010; Zordan et al., 2011; Kempf et al., 2012).

در حال حاضر این جنس شامل ۲۳ گونه شناخته شده و ۱۲ گونه ژنتیکی وابسته است. به دلیل دشواری در شناسایی دقیق تمام اعضای این جنس در سطح گونه و با توجه به پیشرفت روش‌های جدید مولکولی، طبقه‌بندی اعضای جنس *اسینتوباکتر* به طور مداوم در تغییر می‌باشد (La Scola et al., 2006; Gundi et al., 2009; Nemec et al., 2011).

در جنس *اسنیتوباکتر*، گونه *اسینتوباکتربومانی* (*Acinetobacter baumannii*) به لحاظ بالینی مهم‌ترین گونه است. این گونه یک پاتوژن فرصت‌طلب است که در انسان به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل مولد عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان‌ها محسوب می‌شود (Peleg et al., 2008; Turton et al., 2010).

در حیوانات، عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتربومانی* هر چند به ندرت گزارش شده است اما افزایش تعداد گزارشات از بسیاری از کشورها نشان دهنده یک مشکل در حال ظهور در حیوانات می‌باشد (Kumsa et al., 2012).

عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *اسینتوباکتربومانی* در سگ و گربه در بخش مراقبت‌های ویژه در سوئیس (Francey et al., 2000)، عفونت ناشی از *اسینتوباکتربومانی* در حیوانات خانگی و اسب در سوییس (Endimiani et al., 2011)، جداسازی گونه‌های *اسینتوباکتر* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در کلینیک‌های دامپزشکی در آلمان (Zordan et al., 2011)، شناسایی *اسینتوباکتربومانی* در گاو و خوک کشتار شده در اسکاتلند (Hamouda et al., 2011)، جداسازی گونه‌های *اسینتوباکتر* مولد کرباپنماز از گاو در فرانسه (Poirel et al., 2012)، ردیابی گونه‌های *اسینتوباکتر* حامل ژن*OXA-23* (مقاومت به اگزاسیلین) در مدفوع اسب در بلژیک (Smet et al., 2012) نمونه‌ای از گزارشاتی است که نشان‌گر اهمیت روز افزون عفونت‌های ناشی از گونه‌های *اسینتوباکتر* در علم دامپزشکی است.

یکی از مشکلات موجود در مورد *اسینتوباکتربومانی* ظهور سویه‌هایی با مقاومت چندداروییی است که به کلاس‌های مختلف آنتی بیوتیک‌ها نظیر بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها مقاوم‌اند (توکل و ممتاز، ۱۳۹۴).

این مقاومت‌ها بیشتر با واسطه ژن‌هایی انجام می‌شود که بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مثل ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها قرار داشته و به سادگی در میان باکتری‌ها انتشار می‌یابند. به نظر می‌رسد عوامل ضدمیکروبی جدیدی که بتواند در مقابل این باکتری فعالیت مؤثر داشته باشند در آینده نزدیک در دسترس نباشد که این موضوع اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری را بیشتر می‌کند (Khamesipour et al., 2017).

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین‌تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی‌بیوتیک جهت تایپینگ میکروب‌ها استفاده می‌شد، ولی امروزه روش‌های تایپینگ مولکولی بسیار کارآمدتر از روش‌های قبلی می‌باشند. تکنیک‌های مولکولی که برای تایپینگ میکروب‌ها بکار می‌روند عبارتند از: PFGE، روش‌های متکی بر برش آنزیمی، آنالیز پلاسمیدها و روش‌های تیپ‌بندی براساس PCR نظیر Rep-PCR, RAPD-PCR, ERIC-PCR (فراهانی و همکاران، ۱۳۹۱).

اخیراً روش‌های جدید مولکولی نظیر تایپینگ ترادف‌یابی چند جایگاهی (MLST= Multilocus sequence typing) که اساس آن بررسی تفاوت آللی در توالی نوکلئوتیدی ژن‌های خانه‌دار (House Keeping Genes) می‌باشد، کاربرد فراوانی در بررسی روابط خویشاوندی و ژنتیکی ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* پیدا کرده است. ژن‌های خانه‌دار به ژن‌هایی اطلاق می‌شود که جزء ژن‌های ساختاری بوده و در بیشتر یا تمام سلول‌ها بیان می‌شوند و سلول‌ها برای انجام اعمال متابولیکی خود به آن‌ها نیاز دارند. با توجه به این که هریک از این ژن‌ها توالی‌های متفاوتی در داخل یک سویه باکتریایی به عنوان آلل متمایزکننده اختصاصی دارند لذا وجود آلل‌های متفاوت از ژن‌های خانه‌دار در میان ایزوله‌های یک سروتیپ و در نتیجه الگوهای متفاوت تایپینگ می‌تواند در بررسی ارتباط کلونال ایزوله‌های مورد بررسی بسیار حائز اهمیت باشد (محمدی و ممتاز، ۱۳۹۶).

مطالعات مختلفی در خصوص بکارگیری روش‌های نوین مولکولی از جمله MLST روی ژنوتایپینگ ایزوله‌های این باکتری در انسان انجام شده (محمدی و ممتاز ۱۳۹۶)، اما استفاده از این روش در نمونه‌های دامی در دنیا محدود و در ایران وجود ندارد. در مطالعه حاضر با ردیابی هفت ژن خانه‌دار (Citrate Synthase) *gyrB*, (DNA gyrase subunitB)*gltA*، (Glucose DehydrogenaseB) *gdhB*، (Homologous recombination factor) *recA*، (chaperonin 60-kDa) *cpn60*، (RNApolymerase sigma factor)*rpoD*,(Glucose-6- phosphate isomerase) *gpi* در ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی*جدا

شده از گوشت خام دام و طیور، ضمن تعیین آلل‌های مختلف این ژن‌ها، کلون ژنتیکی (ST) مربوط به هر ایزوله تعیین و ارتباط کلونال آن‌ها تعیین شده و ارتباط بین کلون‌های شناسایی شده با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده بررسی شده است.

روش کار

ایزوله‌های باکتری

تعداد ۲۲ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* که در مطالعات قبلی از گوشت خام دام و طیور (۱۰ ایزوله از گوشت مرغ، ۳ ایزوله از گوشت بوقلمون، ۲ ایزوله از گوشت گوسفند، ۳ ایزوله از گوشت شتر و ۴ ایزوله از گوشت گاو) جدا شده بودند انتخاب گردید. این ایزوله‌ها در محیط کشت لوریا برتانی (LB) حاوی ۳۰ درصد گلیسیرین در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد به شکل گلیسیرینه نگهداری شده بودند. جهت احیاء ایزوله‌ها، نمونه‌های گلیسیرینه به مدت ۲۴ ساعت در محیط مایع لوریا-برتانی کشت داده شده و پس از یک نوبت تجدید کشت مجدد در این محیط جهت انجام آزمایش‌های مورد نظر انتخاب شدند.

استخراج DNA

DNA ژنومی از باکتری‌های رشد یافته در محیط لوریا-برتانی با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن–ایران (DNA Extraction Kit, DNP^{TM}Kit) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تایید مولکولی ایزوله‌های باکتریایی

به منظور تایید قطعی *اسینتوباکتربومانی* در ایزوله‌های مورد مطالعه و اطمینان از عدم آلودگی آن‌ها در طول مدت نگهداری آن‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، از آزمایش PCR در حضور زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ (با ردیابی ژن *16S-23S ribosomal DNA*) استفاده شد (Chiang et al., 2011).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *16s-23srDNA* در ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی*

نام ژن	توالی پرایمر(`۳-`۵)	اندازه محصول
16s-23srDNA	CATTATCACGGTAATTAGTG AGAGCACTGTGCACTTAAG	۲۰۸

در این مرحله آزمایش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۱/۵ میلی مول کلریدمنیزیوم (Mgcl2)، ۲۰۰ میکرولیتر dNTP Mix (فرمنتاس-لیتوانی)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R (سیناژن-ایران)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (فرمنتاس-لیتوانی) و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله انجام گرفت.

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از:

یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۷ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه.

آزمون تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ساخت شرکت پادتن‌طب-ایران، براساس دستورالعمل CLSI (2017) با استفاده از روش انتشار دیسک در محیط مولرهینتون‌آگار ارزیابی شد. شایان ذکر است از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی کیفیت آنتی‌بیوگرام و از سویه استاندارد *اسینتوباکتربومانی* ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت کیفیت آنتی‌بیوگرام استفاده شد.

آنتی بیوتیک‌های آزمون شده شامل: تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم/دیسک)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم/دیسک)، تری متوپریم-سولفومتوکسازول (۲۵ میکروگرم/دیسک)،

توبرامایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم/دیسک)، آمیکاسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، ریفامپین (۵ میکروگرم/دیسک)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، تری‌متوپریم (۵ میکروگرم/دیسک)، لووفلوکساسین (۵ میکروگرم/دیسک)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم/دیسک)، مروپنم (۱۰ میکروگرم/دیسک)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم/دیسک)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم/دیسک)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم/دیسک)، بودند. در این روش سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح شد. پس از گذاشتن دیسک‌ها در محیط کشت و ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به عنوان حساس و مقاوم ثبت شد.

آزمایش MLST

روش MLST جهت بررسی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از نمونه‌های گوشت خام دام و طیور طبق دستورالعمل توصیه شده در سایت https://pubmlst.org/abaumannii انجام گرفت. در این روش توالی نوکلئوتیدی مربوط به ۷ ژن خانه‌دار *اسینتوباکتربومانی* بعد از تکثیر در آزمایش PCR، تعیین توالی شده و توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده برای ۷ ژن مربوط به هر ایزوله با توالی‌های قبلی ثبت شده در این سایت مقایسه و ضمن تعیین شماره آلل‌های مربوط به هر ژن، ST مربوط به هر ایزوله تعیین گردید.

برای انجام این روش از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۲ که از سایت رسمی MLST انتخاب شده‌اند استفاده گردید:

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ۷ ژن خانه‌دار در *اسینتوباکتربومانی*

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول
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	۵۹۴
gdhB	GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C	۷۷۴
recA	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	۴۲۵
cpn60	GGT GCT CAA CTT GTT CGT GA CAC CGA AAC CAG GAG CTT TA	۶۴۰
gpi	GAA ATT TCC GGA GCT CAC AA TCA GGA GCA ATA CCC CAC TC	۴۶۵
rpoD	ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT	۶۷۲

تکثیر هر کدام از ژن‌های فوق به صورت جداگانه (در قالب PCR معمولی) انجام گرفت.

واکنشPCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر 10XPCR buffer، ۱ میلی‌مول Mgcl2، ۱۵۰ میکرومول dNTP mix، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R مربوط به هر ژن، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله انجام شد.

برنامه حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های خانه‌دار به شرح زیر بود:

یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

محصول PCR مربوط به هر مرحله از انجام آزمایش PCR روی ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز گردید.

الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً ۴۵ دقیقه در حضور مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی DNA (فرمنتاس-لیتوانی) انجام گرفت و بعد از مشاهده ژل با نور UV با دستگاه UVitech (انگلستان) از ژل حاصله تصویر برداری و ثبت گردید.

محصول PCR مربوط به هر ژن از هر ایزوله (مجموعاً ۱۵۴ محصول PCR) با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR (PCR Clean up- vivantis, Malasia) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص گردید.

نمونه‌های تخلیص شده جهت تعیین توالی ژن‌های تکثیر یافته در هر ایزوله به شرکت Macrogen کره ارسال و با استفاده از دستگاه ABI 3730 XL و روش Sanger Sequencing تعیین توالی گردید.

پس از تعیین شماره آلل‌های مربوط به هر ژن، شماره آلل‌های مربوط به ۷ ژن خانه‌دار *اسینتوباکتربومانی* یعنی ژن‌های *gltA*، *gyrB*، *gdhB*، *recA*، *cpn60*، *gpi*، *rpoD*، در قسمت Profile QueryAllelic سایت وارد وST مربوط به هر ایزوله تعیین گردید.

ارتباط فیلوژنی بین ۲۲ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* مورد مطالعه که توالی نوکلئوتیدی مربوط به ۷ ژن خانه‌دار در آن‌ها تعیین شده بود توسط الگوریتم eBURST (v.3) در سایتhttp://eburst.mlst.net بررسی گردید.

نتایج

در ۲۲ ایزوله جدا شده از گوشت خام دام و طیور، بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به تتراسیکلین با فراوانی ۹۰/۹۰ درصد و کمترین میزان مربوط به دو آنتی‌بیوتیک آزیترومایسین و ایمی‌پنم با ۹/۰۹ درصد بود.

در ۲۲ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* مورد بررسی ۵ پروفایل(کلون=ST) ژنتیکی شامل ST15، ST10، ST12، ST25وST25 شناسایی شد وST مربوط به ۵ ایزوله با اطلاعات موجود در سایت MLST مطابقت نداشت که به عنوان ایزوله‌های غیر قابل تیپ‌بندی معرفی شدند. فراوانی STهای شناخته شده در ۲۲ ایزوله مورد بررسی در جدول ۳ آورده شده است:

جدول ۳- کلون‌های ژنتیکی غالب شناخته شده در ۲۲ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از گوشت دام و طیور

STکلون	تعداد ایزوله	فراوانی (درصد)
ST15	۳	۳۳/۳۳
ST10	۲	۲۲/۲۲
ST12	۴	۱۶/۶۶
ST28	۴	۱۱/۱۱
ST25	۴	۱۱/۱۱
Non ST-typeable	۵	۵/۵۵

در قسمت دیگر از این تحقیق الگوی آلل‌های مختلف ژن‌های خانه‌دار در *اسینتوباکتربومانی* یعنی ژن‌های *gltA*، *gyrB*، *gdhB*، *recA*، *cpn60*، *gpi*، *rpoD* در STهای شناخته شده در این مطالعه تعیین شد. در این قسمت توالی تعیین شده مربوط به هر ژن خانه‌دار در قسمت Single Locus از LocusQuery سایت MLST وارد و شماره آلل‌های مربوط به هر ژن از هر ST مشخص گردید. شماره آلل‌ها در انواع STهای شناخته شده در جدول ۴ آورده شده است:

جدول ۴- شماره آلل‌های مربوط به ۷ ژن خانه‌دار در STهای شناخته شده در ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از موارد باکتریمی

ST	*gltA*	*gyrB*	*gdhB*	*recA*	*cpn60*	*gpi*	*rpoD*
ST15	۱	۱	۴۱	۶	۲۳	۳۱	۲۶
ST10	۱	۴	۳	۲	۲	۷	۳
ST12	۸	۴	۴	۴	۴	۵	۵
ST28	۱	۱۲	۳	۲	۲	۳۵	۴
ST25	۱	۱	۴۱	۶	۲۳	۳۱	۲۶

ارتباط فیلوژنی بین ایزوله‌ها توسط الگوریتم eBURSTv3 (از سایت eburst.MLST.net) بررسی شد. براساس الگوی سکانس تایپ بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار GelClust و روش ماتریکس فاصله طبق مدل

UPGMA، داده‌ها آنالیز و دندروگرام الگوی کلاسترینگ از میان ۲۲ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* مورد مطالعه، ۱۷ ایزوله تعیین تیپ شدند و ST آن‌ها با STهای ثبت شده در بانک اطلاعاتی سایت MLST مطابقت داشت. این ۲۲ ایزوله در ۴ کلاستر از A تا D قرار گرفتند که در نمودار ۱ الگوی دندروگرام این ایزوله‌ها ترسیم شده است:

نمودار ۱- دندروگرام ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* بر اساس STهای تعیین شده

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کلون‌های شناسایی شده در ۲۲ ایزوله به تفکیک در جدول ۵ آورده شده است.

بحث

اسینتوباکتربومانی از شایع‌ترین عوامل مولد عفونت‌های بیمارستانی در انسان است که در چند ساله اخیر نقش آن در ایجاد عفونت‌های دامی مورد توجه قرار گرفته و طبق گزارش محققین مختلف سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* از حیوانات مختلف از جمله اردک، کبوتر، جوجه‌ها، الاغ، خرگوش، حیوانات خانگی (گربه‌ها و سگ‌ها)، موش، دام‌های بزرگ (گاو، گوسفند، بز، خوک، اسب) و حتی بندپایان جداسازی شده است (Endimiani et al., 2011; Jung and Park 2015; Al Atrouni et al., 2016).

اهمیت اصلی باکتری در ایجاد عفونت‌های بالینی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی شایع در این گونه است که امروزه اکثر بدست آمده از مجموع STها ترسیم گردید.

سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان، مقاوم شده‌اند (Kiani et al., 2016).

مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از گوشت خام دام و طیور مصرفی در ایران و تعیین ارتباط ژنتیکی این ایزوله‌ها با هم انجام شد.

در انتخاب روش یا روش‌های تیپ‌بندی باید قدرت تفکیک، تکرارپذیری، سادگی روش، وسعت کاربرد، سرعت انجام و سادگی تفسیر داده‌ها را توجه نمود. روش‌های مولکولی جدید برخلاف روش‌های فنوتیپی که مبتنی بر بررسی ویژگی‌های ظاهری و تغییرپذیر می‌باشند، بر بررسی ترادف تغییرناپذیر یا کمتر تغییرپذیر ژنی میکروارگانیسم هدف، استوار بوده و کمتر تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. این روش‌ها نسبت به روش‌های سنتی واجد قدرت افتراق‌دهی بالاتر، کاربرد گسترده‌تر برای انواع مختلف گونه‌های میکروبی و سرعت بالاتر می‌باشند (Tenover et al., 1997; Loeb, 2015). یکی از روش‌های دقیق تایپینگ باکتری‌ها از جمله *اسینتوباکتربومانی* و تعیین ارتباط کلونال بین سویه‌های مختلف آن روش MLST است. در مطالعه حاضر نیز از همین روش در دسته‌بندی ژنتیکی ۲۲ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از گوشت خام دام و طیور استفاده شد.

بیشتر مطالعات انجام شده در به کارگیری این روش روی ایزوله‌های انسانی بوده طوری که محمدی و ممتاز (۱۳۹۶)، در مطالعه‌ای روی ۳۶ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از موارد باکتریمی در بیمارستان‌های شهر تهران، ۵ کلون ST25، ST136، ST307، ST327، ST328 را شناسایی کردند که STهای تعیین شده در ۵ خوشه ژنتیکی A، B، C، D، E قرار گرفتند (محمدی و ممتاز، ۱۳۹۶).

جدول ۵- ارتباط بین STهای شناسایی شده در ۲۲ ایزوله مورد مطالعه با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ST	شماره ایزوله	منبع ایزوله	استرپتومایسین	جنتامایسین	آمیکاسین	تتراسایکلین	کوتریموکسازول	نیتروفورانتوئین	آزیترومایسین	ریفامپین	ارتیرومایسین
ST10	۱	گوشت مرغ	−	−	−	+	+	−	−	−	+
	۱۴	گوشت مرغ	−	+	+	+	+	−	−	−	−
ST15	۱۲	گوشت مرغ	+	+	−	+	+	−	−	−	−
	۱۵	گوشت مرغ	+	+	−	+	+	−	−	−	−
	۱۸	گوشت بوقلمون	−	−	−	+	−	−	+	−	−
ST12	۲	گوشت شتر	+	+	−	+	−	−	−	−	−
	۱۰	گوشت گوسفند	+	+	+	+	−	−	−	−	+
	۱۶	گوشت گوسفند	−	+	+	+	+	+	−	−	+
	۸	گوشت مرغ	+	+	+	+	−	−	−	−	−
ST28	۳	گوشت مرغ	−	−	−	+	+	−	−	−	+
	۴	گوشت گاو	−	+	−	+	+	−	−	−	+
	۵	گوشت بوقلمون	−	+	−	+	+	−	−	−	+
	۹	گوشت شتر	+	−	−	−	−	−	+	−	−
ST25	۱۹	گوشت مرغ	−	−	−	+	+	+	−	−	−
	۲۲	گوشت مرغ	−	−	−	+	+	+	−	−	−
	۲۰	گوشت مرغ	−	+	−	+	−	+	−	−	−
	۲۱	گوشت مرغ	−	−	−	+	−	−	−	−	+
Non Typeable	۱۷	گوشت گاو	+	−	−	+	−	−	−	+	−
	۷	گوشت گاو	−	−	−	−	−	+	−	+	−
	۶	گوشت گاو	−	+	+	+	+	−	−	−	−
	۱۳	گوشت بوقلمون	−	−	+	+	−	−	−	−	+
	۱۷	گوشت گاو	+	−	−	+	−	−	−	+	−
	جمع کل		۷	۱۱	۶	۲۰	۱۲	۵	۲	۳	۸

در مطالعه Hu و همکاران (۲۰۱۷)، ۱۰۸ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از عفونت‌های خون در فاصله زمانی ژانویه ۲۰۱۲ تا دسامبر ۲۰۱۳ در تایوان به روش MLST ژنوتایپ شدند که در مجموع دو کلون ST787 با فراوانی ۵۴/۸۴ درصد و ST455 با فراوانی ۴۵/۱۶ درصد شناسایی شد (Hu et al., 2017).

در مطالعه Seo و همکاران در کره‌جنوبی (۲۰۱۴)، ۳۴ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* که با ردیابی ژن‌های *16srRNA* و*gpi* در ۵۳ نمونه عفونی در چهار بیمارستان وابسته به دانشگاه‌ها، جدا شده بودند به دو روش ERIC-PCR و MLST آنالیز شدند. در نشانگر ERIC-PCR، ۳۴ ایزوله دارای ۱۴ الگوی باندی متفاوت بودند و در آزمایش MLST در قالب ۶ کلون مختلف ST92، ST105، ST138، ST169،ST262 و ST357 طبقه‌بندی شدند. در این میان کلون ژنتیکی غالب در ایزوله‌ها کلون ST138 بود (Seo et al., 2014).

استفاده از روش MLST در دامپزشکی بسیار محدود است. Endimiani و همکاران (۲۰۱۱)، ۱۹ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از حیوانات خانگی و اسب را با این ایده که خصوصیات مولکولی ایزوله‌های دامی و انسانی مشابه است، به دو روش مولکولی Rep-PCR و MLST آنالیز کردند. در آزمایش Rep-PCR دو کلون اصلی A (۸ ایزوله) و B (۹ ایزوله) شناسایی شد که کلون A واجد ST12 (معادل کلون شماره II ایزوله‌های انسانی در اروپا) و کلون B واجد ST15 (معادل کلون شماره I ایزوله‌های انسانی در اروپا) بودند. دو ایزوله دامی در قالب دو کلون ST10 و ST20 طبقه‌بندی شدند که تشابهی با ایزوله‌های انسانی نداشتند. در این بررسی بیشتر ایزوله‌های جدا شده از موارد دامی واجد ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت به جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و کرباپنم‌ها بودند. تشابه کلون‌های شناخته شده در ایزوله‌های دامی با انسانی نشان داد که حیوانات می‌توانند منبع مهمی از انتقال *اسینتوباکترهای* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک به انسان باشند (Endimiani et al., 2011).

در مطالعه ما در ۲۲ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از گوشت خام دام و طیور، ۵ ایزوله با اطلاعات موجود در سایت MLST قابل تیپ‌بندی نبودند و مجموعا ۵ پروفایل ST15، ST10، ST12، ST25 و ST25 شناسایی شد. بیشتر ایزوله‌های مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بودند و در این میان بالاترین میزان مقاومت در برابر تتراسیکلین (۹۰/۹۰ درصد)، تری‌متوپریم (۵۹/۰۹ درصد)، کوتریموکسازول (۵۴/۵۴ درصد) و جنتامایسین (۵۰ درصد) بود. شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه ایمی‌پنم (۹/۰۹ درصد)، آزیترومایسین (۹/۰۹ درصد)، مروپنم (۱۳/۶۳ درصد) و ریفامپین (۱۳/۶۳ درصد) پایین‌تر مقدار بود (جدول ۵). ایزوله‌های جدا شده از گوشت طیور نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک ریفامپین، آزیترومایسین و توبرامایسین حساس بودند.

ایزوله‌های متعلق به یک کلون ژنتیکی دارای الگوی مقاومتی یکسان بودند، طوری که ایزوله‌های ۱۲ و ۱۵ (با منشاء گوشت مرغ) متعلق به ST15، ایزوله‌های ۴ و ۵ (با منشاء گوشت گاو و گوشت بوقلمون) متعلق به ST28، ایزوله‌های ۱۹ و ۲۲ (با منشاء گوشت مرغ) متعلق به ST25 دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشابه هستند (جدول ۵).

یک علت احتمالی برای تشابه مولکولی سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* که از حیوانات مختلف جدا می‌شود، منبع مشترک این عفونت هستند. همچنین ممکن است به علت تماس نزدیک بین گاو و مرغ، گاو و بوقلمون و انتقال سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* با همان تیپ مولکولی باشد. متاسفانه، دامپروران ایرانی اغلب گونه‌های مختلف حیوانات در مجاورت هم‌دیگر نگهداری و پرورش می‌دهند. این ممکن است باعث

انتقال آسان سویه‌های این باکتری بین گونه‌های مختلف دامی شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ۵ کلون ژنتیکی مختلف شامل ST10، ST12، ST15، ST25 و ST8 در ایزوله‌های مورد مطالعه شناسایی شد که در بررسی ارتباط فیلوژنی در ۴ کلاستر از A تا D قرار گرفتند.

نتایج تحقیق حاضر حکایت از آن داشت که سویه‌های در گردش *اسینتوباکتربومانی* در نمونه‌های گوشت خام دام و طیور با دارا بودن ST های متفاوت و قرار گرفتن در ۴ خوشه ژنتیکی از گوناگونی ژنتیکی بالایی برخوردار هستند و اکثرا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان بیماری‌های عفونی مقاوم می‌باشند. اکثر ایزوله‌های جدا شده از گوشت مرغ و بوقلمون در کلون‌های مشترک قرار گرفته و بعضی از آن‌ها دارای الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشابه هستند و حتی ایزوله‌های جدا شده از منابع متفاوت بعضا دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پروفایل مشابه هستند که این امر امکان انتقال سویه‌های مختلف *اسینتوباکتربومانی* بین دام‌های مختلف و بالتبع انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انسان را نشان می‌دهد. نتایج تحقیقات مشابه در زمینه اپیدمیولوژی عفونت‌های *اسینتوباکتر* با استفاده از روش MLST، اثبات‌کننده ریز تکامل این پاتوژن و همچنین انتقال آلودگی ناشی از آن از میزبانی به میزبان دیگر بوده و می‌تواند به عنوان یک روش قابل قبول در کنترل عفونت‌های بیمارستانی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱. توکل، مرضیه.، ممتاز، حسن. ۱۳۹۴. ردیابی شایع‌ترین ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از عفونت‌های *بیمارستانی* و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آن‌ها. زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها، ۴دوره ۴، شماره ۱۴، صفحات ۸۲-۷۱.

۲. فراهانی، ندا.، میرنژاد، رضا.، احمدی، زینب.، امیر.، مظفری، نور.، مسجدیان، فرامرز. ۱۳۹۱. تایپینگ مولکولی سویه‌های بالینی اسینتوباکتربومانی در شهر تهران با روش پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، دوره ۲، شماره ۴، صفحات ۲۶۵-۲۵۹.

۳. محمدی، زهره.، ممتاز، حسن. ۱۳۹۶. تایپینگ مولکولی سویه های *اسینتوباکتربومانی* جدا شده از عفونت‌های خون با روش ترادف‌یابی چندجایگاهی (MLST). فصلنامه علمی‌پژوهشی دنیای میکروب‌ها، دوره ۱۰، شماره ۲، صفحات ۱۱۳-۱۰۴.

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

5. Chiang, M.C., Kuo, S.C., Chen, Y.C., Lee, Y.T., Chen, T.L., and Fung, C.P. 2011. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Acinetobacter baumannii* in endotracheal aspirates from patients in the intensive care unit. J Microbiol Immunol Infect. 44(2): 106-110.

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

7. Endimiani, A., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Bertschy, I., Rossano, A., Koch, C., Gerber, V., Francey, T., Bonomo, R.A., and Perreten, V. 2011. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. J Antimicrob Chemother. 66(10): 2248-2254.

8. Francey, T., Gaschen, F., Nicolet, J., and Burnens, A.P. 2000. The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. J Vet Int Med. 14(2): 177-183.

9. Gundi, V.A., Dijkshoorn, L., Burignat, S., Raoult, D., and La Scola, B. 2009. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging Acinetobacter species. Microbiol. 155(7): 2333-2341.
10. Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., and Amyes, S.G. 2011. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. Int J Antimicrob Agents. 38(4): 314-318.
11. Hu, Y.F., Hou, C.J.Y., Kuo, C.F., Wang, N.Y., Wu, A.Y.J., Leung, C.H., Liu, C.P., and Yeh, H.I. 2017. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST787 in clinical isolates from blood in a tertiary teaching hospital in Northern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 50(5): 640-645.
12. Jung, J., and Park, W. 2015. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 99(6): 2533-2548.
13. Kempf, M., Rolain, J.M., Diatta, G., Azza, S., Samb, B., Mediannikov, O., Sow, A.G., Diene, S.M., Fenollar, F., and Raoult, D. 2012. Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. PLoS One. 7(6): e39495.
14. Khamesipour, F., Momtaz, H., Tavakol, M., and Awosile, B. 2017. Determination of antimicrobial resistance and resistant genes in *Acinetobacter baumannii* from human clinical samples. West Indian Med J. 66(1): 56-64.
15. Kiani, S., Momtaz, H., Serajian, A.A., and Tajbakhsh, E., 2016. Detection of integrons in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from the nosocomial infections of Ahvaz city and their relation with the resistance pattern. Int J Med Lab. 3(1): 50-63.
16. Kumsa, B., Socolovschi, C., Parola, P., Rolain, J.M., and Raoult, D. 2012. Molecular detection of *Acinetobacter* species in lice and keds of domestic animals in Oromia Regional State, Ethiopia. PloS one. 7(12): e52377.
17. La Scola, B., Gundi, V.A., Khamis, A., and Raoult, D. 2006. Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 44(3): 827-832.
18. Loeb, M., 2013. Host genomics in infectious diseases. Infect Chemother. 45(3): 253-259.
19. Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., and Dijkshoorn, L. 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticus–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov.(formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov.(formerly Acinetobacter genomic species 13TU). Res Microbiol. 162(4): 393-404.
20. Peleg, A.Y., Seifert, H., and Paterson, D.L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 21(3): 538-582.
21. Poirel, L., Berçot, B., Millemann, Y., Bonnin, R.A., Pannaux, G., and Nordmann, P. 2012. Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in cattle, France. Emerg Infect Dis. 18(3): 523.
22. Seo, I., Lee, J., Son, S.Y., and Han, K. 2014. Comparative study of different molecular methods for typing of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from University Hospitals. Genes & Genomics. 36(5): 551-558.
23. Smet, A., Boyen, F., Pasmans, F., Butaye, P., Martens, A., Nemec, A., Deschaght, P., Vaneechoutte, M., and Haesebrouck, F. 2012. OXA-23-producing *Acinetobacter* species from horses: a public health hazard? J Antimicrob Chemother. 67(12): 3009-3010.
24. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., and Goering, R.V. 1997. How to select and

interpret molecular strain typing methods for *epidemiological* studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. Infect Cont Hosp Epidemiol. 18(6): 426-439.

25. Turton, J. F., Shah, J., Ozongwu, C., and Pike, R. 2010. Incidence of Acinetobacter species other than *A. baumannii* among clinical isolates of Acinetobacter: evidence for emerging species. J Clin Microbiol. 48(4): 1445–1449.

26. Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., van der Reijden, T., van den Broek, P., Baljer, G., and Dijkshoorn, L. 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. Emerg Infect Dis. 17(9): 1751.

Typing of the *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw of poultry and livestock meat using Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Tavakol M[1], Momtaz H[1]*, Mohajeri P[1,2], Shokoohizadeh L[1,3], Tajbakhsh E[1]

1. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Microbiology, Nosocomial Infection Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
3. Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

***Corresponding author:** *hamomtaz@iaushk.ac.ir*

Received: 14 June 2018 Accepted: 15 September 2018

Abstract

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) strains with multiple drug resistance are mainly opportunistic pathogens in the development of hospital infections and as an emerging contaminant in livestock-based foods. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance pattern and genotyping of this bacterium strains in raw meat of poultry and livestock. 22 strains isolated from raw meat were tested by multi-locus sequence typing and simple disk diffusion methods. The highest antimicrobial resistance was observed to tetracycline with 90.9% and the least antibiotic resistance was azithromycin and imipenem with 9.09%. Five strains were identified as non-typing isolates in 22 isolates of *A. baumannii*. Five genetic profiles (Sequence Types=ST) including ST15, ST10, ST12, ST25, ST25 were identified. Identifying the acceptable level of genetic variation among isolates using the MLST technique indicates that this method is considered as a useful method in the study and typing of *Acinetobacter* spp. strains and can be strains isolated from different origins in different groups. In this study, it was found that by sequencing of house-keeping genes, it is possible to typing of *Acinetobacter* spp. strains, and this amount of polymorphism indicates that this technique is a useful method for analyzing the genetic diversity of *A. baumannii* strains is a source of animal origin.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, raw meat, antibiotic resistance, multi-locus sequence typing.