مقاله تحقیقی

شناسایی مولکولی باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی بیمارستان‌های کرمانشاه

سیناسادات امامی [۱]، جمیله نوروزی [۱،*]، رامین عبیری [۲]، پرویز مهاجری [۲]

۱. گروه میکروب شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

***مسئول مکاتبات:** nowroozi@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه علوم پزشکی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱/۳۰ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۳/۱۵

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد۱۵- شماره ۲- تابستان۱۳۹۹

چکیده

هدف از این تحقیق شناسایی مولکولی باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی بیمارستان‌های کرمانشاه بود. لذا ۵۰۰ نمونه بالینی و محیطی مختلف جمع‌آوری و توسط تست‌های بیوشیمیایی و PCR شناسایی شد. در مرحله بعد سویه‌های باکتری با تکثیر ۷ لوکوس ژنی شامل atpD ، gapA، guaA، mutM، nuoD، ppsA و recA مشخص و تعین توالی شد. رسم درخت فیلوژنی مربوط به سویه‌ها با نرم‌افزار MEGAv.7 صورت گرفت. از میان ۵۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از بیمارستان‌ها، تعداد ۲۸ ایزوله *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* شناسایی شدند. از این میان ۱۳ ایزوله مربوط به نمونه‌های محیطی (۷ ایزوله (۵۳/۸ ٪) از محیط‌های مرطوب و ۶ ایزوله (۴۶/۲ ٪) از محیط‌های خشک) و ۱۵ ایزوله نیز مربوط به نمونه‌های بالینی (۱۲ ایزوله (۸۰ ٪) از نمونه خلط بیماران و ۳ ایزوله (۲۰٪) از خون بیماران) بودند. در تعداد اندکی سویه مشترک نیز میان نمونه‌های بالینی و محیطی یافت شد. براساس درخت فیلوژنی، ۲۸ ایزوله جمع‌آوری شده مربوط به ۲۱ سویه شناسایی شده از باکتری است که به‌دلیل شباهت ژنتیکی ۱۰۰ ٪ برخی از ایزوله‌ها بوده است. تمام سویه‌های در حال گردش باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* در شهر کرمانشاه متعلق به یک الگوی ملکولی خاص بوده و از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نمی‌باشند که احتمال آلودگی بیماران به باکتری را از طریق محیط‌های آلوده بیمارستانی افزایش می‌دهد. بنابراین استفاده از روش‌های ملکولی افتراقی با قدرت بالا به‌عنوان روش قابل قبول در کنترل این باکتری پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، شناسایی ملکولی، ژن‌های خانگی، محیط‌های بیمارستانی

مقدمه

استنوتروفوموناس مالتوفیلیا (*Stenotrophomonas maltophilia*)، باکتری پاتوژن فرصت‌طلب گرم منفی است که به ویژه در بیماران بستری شده یا در معرض خطر، سبب ایجاد عفونت می‌شود و معمولا این عفونت با مرگ و میر بالا همراه است (۱, ۲) این باکتری متعلق به زیر رده گاما-پروتئوباکترها با خواص مفید برای بهبود زیستگاه محیطی و کنترل زیستی است (۳)، که معمولا در خاک یافت می‌شود و بیش‌ترین محل استقرار آن ریزوسفر می‌باشد (۴). با این وجود، سویه‌های این باکتری در آب‌های سطحی، چاه‌ها، فاضلاب و محیط زیست دریایی نیز یافت شده‌اند (۵). هم‌چنین *S. maltophilia* به‌عنوان عامل آلودگی آب آشامیدنی و غذا نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۱).

در سال‌های اخیر *S. maltophilia* به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب در عفونت‌های بیمارستانی نقش قابل توجهی داشته است (۶). یکی دیگر از نقاط بحرانی، مقاومت چندگانه این باکتری به طیف گسترده‌ای از ترکیبات ضد میکروبی است که به نوبه خود سبب ایجاد مشکل در درمان بیماران آلوده به این میکروب می شود. همچنین می‌تواند منجر به تکثیر ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در میان سویه های مختلف این باکتری شود. استعداد بالای ابتلا به عفونت با *S. maltophilia* در افراد با بیماری‌های شدید و پس از درمان طولانی مدت با آنتی‌بیوتیک، نظیر سیستیک فیبروزیس وHIV، همچنین بیماران سوختگی، بیماران تحت درمان سرطان یا بیماران درمان شده با داروهای سرکوب ایمنی پس از پیوند عضو، مشاهده شده است(۷) عفونت‌های غیر بیمارستانی ناشی از این باکتری نادر است. با این وجود، این نوع عفونت‌ها نیز گزارش شده‌اند (۶). از شایع‌ترین انواع عفونت با باکتری *S. maltophilia* می توان به عفونت‌های پنومونی، عفونت خونی، عفونت‌های دستگاه ادراری یا زخم‌های آلوده اشاره کرد. عفونت‌های دیگر نظیر عفونت چشم، دستگاه گوارش و عفونت‌های دستگاه عصبی نیز به ندرت مشاهده شده است. در مجموع، این وضعیت ایمنی بیمار است که اثر نهایی عفونت را در بدن فرد تعیین می کند (۶, ۷).

اگرچه، *S. maltophilia* یک عامل بیماری‌زا با کشندگی بالا نیست، اما توانایی این باکتری در مواردی نظیر ظرفیت چسبندگی، تشکیل بیوفیلم، آبگریزی، تحرک و سنتز آنزیم‌های خارج سلولی، در روند ایجاد التهاب و افزایش بیماری‌زایی آن تاثیر به‌سزایی دارد(۸,۹). مشکل اصلی برای شناسایی باکتری و مشخص کردن عوامل مؤثر بر بیماری‌زایی، تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی بالای این باکتری است (۱۰). در چندین مطالعه ژنوتیپی تا ۱۵ گروه اصلی ژنتیکی *S. maltophilia* تشخیص داده شده است (۱۱, ۱۲). تاکنون روش‌های مولکولی متنوعی برای شناسایی سویه‌های *S. maltophilia* به‌کار گرفته شده است، از جمله تجزیه و تحلیل تعیین توالی ژنوم، پلی مورفیسم طول قطعه تقویت شده، پلی مورفیسم طول قطعه محدود PCR، تجزیه و تحلیل ژن آنزیم *Gyrase B* و هم‌چنین انگشت نگاری مبتنی بر PCR و روش ژل الکتروفورز پالسی (۱۳, ۱۴).

هدف از مطالعه حاضر بررسی پراکندگی باکتری *S. maltophilia* در میان بیماران بستری و تجهیزات پزشکی مورد استفاده در محیط بیمارستان‌ها می‌باشد. در این مطالعه علاوه بر روش‌های تشخیص شیمیایی از روش تشخیص ملکولی بر پایه روش PCR و با تکیه بر شناسایی ژن‌های خانگی (House Keeping Genes) موجود در این باکتری، استفاده شده است. ژن‌های خانگی ژن‌های ساختاری هستند که در بیش‌تر یا تمام سلول‌ها بیان می‌شوند و سلول برای انجام اعمال متابولیکی خود به آن‌ها نیاز دارد. با توجه به این‌که برای هر کدام از این ژن‌ها توالی متفاوتی در داخل یک جدایه باکتریایی به‌عنوان آلل متمایز کننده وجود دارد، لذا وجود آلل‌های متفاوت از ژن‌های خانگی در میان جدایه‌های یک سروتیپ و در نتیجه الگوهای متفاوت تایپینگ، می‌تواند در بررسی ارتباط کلونال جدایه‌های مورد بررسی حایز اهمیت باشد (۱۵-۱۸). ۷ ژن خانگی شناسایی شده در *باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* شامل*atpD*، *gapA*، *guaA*، *mutM*، *nuoD*، *ppsA* و *recA* در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، جداسازی و تشخیص آزمایشگاهی نمونه‌های *S. maltophilia*

جمع‌آوری نمونه از بیمارستان‌های مختلف شهر کرمانشاه و در طی پنج ماه صورت گرفت. برای این نمونه-برداری‌ها دو منبع بالینی و محیطی در نظر گرفته شد. نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون و خلط از بیماران بستری در بیمارستان‌ها جمع‌آوری شد. در نمونه-گیری از محیط نیز نمونه‌ها از نواحی خشک شامل دستگاه‌های پزشکی، دستگاه دیالیز، ساکشن، کاست رادیوگرافی، کارتکس، کاتتر، گوشی پزشکی،دماسنج، لوله تنفسی، ظروف و اتاق بیمار با مرطوب کردن سواب با سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹ درصد و سائیدن سواب به نواحی خشک مورد نظر و هم‌چنین نمونه‌گیری از نواحی مرطوب مانند شیرهای آب، مخازن، مرطوب کننده‌ها، دوش حمام، سینک ظرف‌شویی، آب سرد کن، محلول‌های ضدعفونی-کننده مصرفی (بتادین، کلروهگزیدین و ستریماید)، مایع صابون و شوینده‌های مصرفی با سائیدن سواب روی تمامی سطوح به‌عنوان منشا مهم عفونت بیمارستانی ناشی از

S. maltophilia از بیمارستان‌های شهر کرمانشاه صورت گرفت.

نمونه‌های بالینی در محیط‌های کشت بلاد آگار و محیط انتخابی استنومدیوم آگار (به‌عنوان محیط اختصاصی شناسایی باکتری *S. maltophilia*) کشت داده شد. در مورد نمونه‌هایی که با سواب از محیط گرفته شد، ابتدا به محیط تریپتیکیز سوی براث منتقل و پس از ۲۵ ساعت، ادامه کار مشابه آن‌چه که در بالا ذکر شد، انجام گردید. پس از رشد باکتری، تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی *S. maltophilia* شامل موارد زیر، برای تشخیص اولیه باکتری انجام شد:

۱. رنگ آمیزی گرم، ۲. تست اکسیداز، ۳. تست کاتالاز، ۴. تولید سولفید هیدروژن، ۵. رشد در محیط سیمون سیترات آگار، ۶. تست ایندول، ۷. لیزین دکربوکسیلاز، ۸ . اورنتین دکربوکسیلاز، ۹. انتشار بوی آمونیاک، ۱۰. تست حرکت، ۱۱. DNase، ۱۲. هیدرولیز ژلاتین، ۱۳. تست اوره آز، ۱۴. رشد در محیط مک کانکی آگار و ۱۵. کشت بر روی محیط استنومدیوم آگار

پس از شناسایی نمونه‌های *S. maltophilia* مقدار مناسب و کافی از کلنی باکتری مورد تایید، در کنار شعله و با استفاده از آنس استریل برداشته شد، سپس در محیط نگه‌دارنده‌TSB حاوی ۲۰ درصد گلیسرول، تلقیح شد. این نمونه‌ها به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند تا برای مراحل بعدی مطالعه، مورد استفاده قرار گیرند. تمامی مواد استفاده شده در این مرحله شامل محیط های کشت و تست‌های شیمیایی از محصولات شرکت مرک (کشور آلمان) بود و آماده‌سازی هر کدام از این مواد براساس پروتکل موجود برای ماده مورد نظر، انجام شد.

آماده سازی نمونه جهت بررسی مولکولی

به‌منظور بررسی ملکولی، جهت شناسایی سویه‌های باکتری *S. maltophilia* استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation Kit ساخت شرکت روچ (کشور آلمان) صورت گرفت. به این ترتیب که ابتدا ایزوله‌های *S. maltophilia* که به کمک روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شده بودند، در محیط کشت MHA (مرک، آلمان) کشت داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۳ تا ۴ کلنی خالص برداشته شد و به محیط LB براث (مرک، آلمان) انتقال داده شده و یک شبانه روز (۲۴ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار نگه‌داری شدند. قبل از شروع استخراج، پروتکل مربوط به کیت به‌طور کامل مطالعه شد و آماده‌سازی‌های لازم صورت گرفت. در نهایت DNA استخراج شده درون دو میکروتیوب تقسیم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا انجام مراحل دیگر نگه‌داری شد.

شناسایی ملکولی *S. maltophilia* با استفاده از تکثیر قطعه ژنی 23srRNA

در مرحله اول تشخیص ملکولی *S. maltophilia*، تکثیر قطعه ژنی 23srRNA با روش PCR با استفاده از پرایمرها و Master Mix تهیه شده از شرکت سیناکلون صورت گرفت. محتویات میکروتیوب واکنش در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. محتویات میکروتیوب واکنش PCR

مواد مورد نیاز	مقدار بر حسب میکرولیتر
Master mix (CAT. NO.:PR901638)	۱۲/۵
23srRNA forward: 5’ CTGGATTGGTTCTAGGAAAACGC 3’	۱
23srRNA reverse: 5' ACGCAGTCACTCCTTGCG 3'	۱
آب مقطر	۷/۵
DNA الگو	۳
حجم نهایی	۲۵

پس از آماده‌سازی محتویات، میکروتیوب واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf AG22331) با برنامه دمایی زیر قرار گرفت تا قطعه مورد نظر تکثیر شود:

واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه، ۳۶ سیکل)، سپس واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۴۵ ثانیه)، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی-گراد (۴۵ ثانیه) و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۴۵ ثانیه) و در پایان مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه).

برای مشاهده محصول PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد و پس از اتمام الکتروفورز، ژل در دستگاه Gel-Documentation برای بررسی وجود قطعه مورد نظر قرار داده شد. نمونه‌هایی که وجود قطعه مورد نظر در آن‌ها به کمک الکتروفورز ژل شناسایی شده بود،

جهت تعیین توالی DNA به شرکت تکاپوزیست ارسال شد.

شناسایی سویه‌های *S. maltophilia* با استفاده از لوکوس‌های ژنی

نمونه‌های جمع‌آوری شده که پس از طی مراحل تشخیص بیوشیمیایی و شناسایی ملکولی قطعه 23srRNA به‌عنوان *S. maltophilia* شناخته شده بودند، در این مرحله برای تشخیص دقیق‌تر و تعیین سویه‌های مختلف باکتری مورد نظر، مورد مطالعه قرار گرفتند. به این ترتیب که ابتدا توالی ژنی هفت ژن خانگی مربوط به باکتری *S. maltophilia* شامل ژن‌های *atpD*، *gapA*، *guaA*، *mutM*، *nuoD*، *ppsA* و *recA* از بانک اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information) NCBI(دریافت شد و به کمک سایت MLST.NET برای این ۷ ژن خانگی، جفت پرایمرهای اختصاصی انتخاب گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ . پرایمرهای مورد استفاده در روش PCR برای تکثیر قطعه ژنی مربوط به ژن‌های خانگی *S. maltophilia*

توالی پرایمر('3 → '5)	طول قطعه ژنی (bp)
atpD *F: ATGAGTCAGGGCAAGATCGTTC* *R: TCCTGCAGGACGCCCATTTC*	۸۵۴
gapA *F: TGGCAATCAAGGTTGGTATCAAC* *R: TTCGCTCTGTGCCTTCACTTC*	۸۰۰
guaA *F: AACGAAGAAAAGCGCTGGTA* *R: ACGGATGGCGGTAGACCAT*	۷۰۰
mutM *F: AACTGCCCGAAGTCGAAAC* *(2r): GAGGATCTCCTTCACCGCATC*	۶۱۴
nuoD *F: TTCGCAACTACACCATGAAC* *R: CAGCGCGACTCCTTGTACTT*	۵۱۴
ppsA *F: CAAGGCGATCCGCATGGTGTATTC* *R: CCTTCGTAGATGAA(A/G)CCGGT(A/G)TC*	۶۱۲
recA *F: ATGGACGAGAACAAGAAGCGC* *R: GGTGATGACCTGCTTGAACGG*	۷۸۳

پرایمرهای مربوط به هر ژن توسط شرکت تکاپوزیست آماده‌سازی شد و سپس به کمک واکنش PCR، تکثیر قطعه مربوط به هر ژن انجام گرفت. محتویات میکروتیوب واکنش PCR در جدول ۳ آمده است (ترکیبات مورد استفاده در این مرحله نیز مطابق مرحله قبل از شرکت سیناکلون تهیه شده بود).

پس از آماده‌سازی محتویات، میکروتیوب واکنش مربوط به هر ژن خانگی در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf AG22331) با برنامه دمایی اختصاصی هر ژن قرار گرفت، تا قطعه مورد نظر برای هر ژن تکثیر شود.

جدول ۳. مواد و مقادیر لازم جهت انجام PCR ژن‌های خانگی

مواد مورد نیاز	مقدار بر حسب میکرولیتر
Master mix	۱۲/۵
پرایمرforward	۱
پرایمر reverse	۱
آب مقطر	۷/۵
DNA الگو	۳
حجم نهایی	۲۵

قابل ذکر است که برنامه دمایی در مراحل مختلف انجام واکنش PCR برای هر هفت ژن خانگی مشابه بوده و تنها تفاوت در مرحله اتصال برای ژن‌ها وجود داشته است. لذا برنامه دمایی برای انجام واکنش PCR به‌صورت زیر بوده است:

- واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه، ۳۶ سیکل)
- واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۴۵ ثانیه)،
- اتصال در دمای ۵۸/۵ (*atpD*)، ۵۷ (*gapA*)، ۵۷/۵ (*guaA*)، ۵۶ (*(nuoD), mutM)*)، ۶۰ (*ppsA*) و ۵۹/۵ (*recA*) درجه سانتی‌گراد (۴۵ ثانیه)
- بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۴۵ ثانیه)
- بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه).

در نهایت پس از انجام واکنش، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد (همان‌طورکه قبلا توضیح داده شد) برده شد و پس از مشاهده قطعه ژنی مورد نظر مربوط به هر ژن، محصولات PCR به شرکت ماکروژن کره جنوبی جهت تعیین توالی فرستاده شد.

بررسی توالی سویه های شناسایی شده برای رسم درخت فیلوژنی

نتایج حاصل از تعیین توالی سویه‌ها با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI و با روش Blast مورد بررسی قرار گرفت. برای رسم درخت فیلوژنی مربوط به سویه‌های به

دست آمده نیز از نرم‌افزار MEGAv.7 براساس روش Neighbour-joining استفاده شد.

نتایج

تست‌های تشخیص آزمایشگاهی *S. maltophilia*

از میان ۵۰۰ نمونه به‌دست آمده از بیماران و محیط-های خشک و مرطوب موجود در بیمارستان‌های مختلف واقع در شهر کرمانشاه ، ۲۸ نمونه از باکتری *S. maltophilia* به کمک تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شد. نتایج حاصل از این بررسی‌ها در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴ . تست‌های تشخیص بیوشیمیایی *S. maltophilia*

انواع تست	نتیجه تست
رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، لیزین دکربوکسیلاز، انتشار بوی آمونیاک، هیدرولیز ژلاتین، حرکت، رشد در محیط سیمون سیترات آگار، رشد در محیط مک کانکی آگار، رشد در محیط استنومدیوم آگار، DNase	مثبت
تست اکسیداز، تولید سولفید هیدروژن، ایندول، اورنتین دکربوکسیلاز، اوره آز	منفی

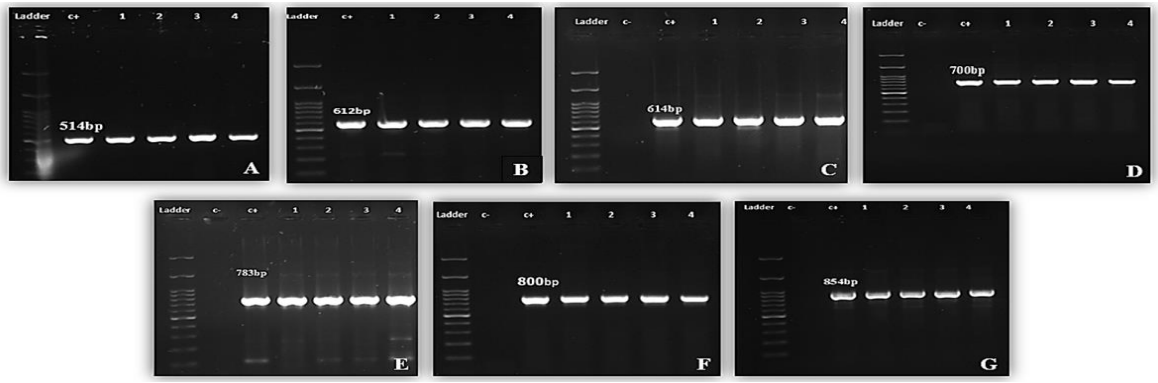
تایید ملکولی ایزوله‌های شناسایی شده *S. maltophilia*

پس از استخراج DNA ایزوله‌های شناسایی شده *S. maltophilia* ، در مرحله اول بررسی ملکولی نمونه‌ها جهت تایید فنوتیپی، وجود ژن 23SrRNA در این ایزوله‌ها با روش PCR بررسی و تایید شد.

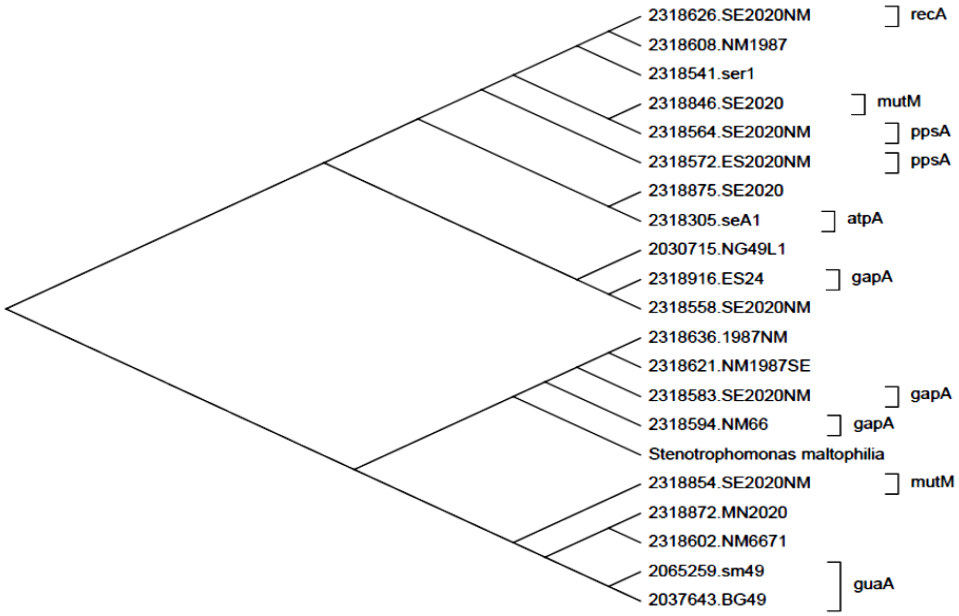
سویه‌های مختلف *S. maltophilia* ، شناسایی شده به کمک لوکوس‌های ۷ ژن خانگی

پس از شناسایی ایزوله‌های باکتری *S. maltophilia* به کمک قطعه ژنی 23SrRNA، برای شناسایی سویه‌های به-دست آمده، وجود۷ ژن خانگی شناخته شده در سویه‌های باکتری مورد نظر با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام PCR الکتروفورز هر یک از ژن‌ها انجام شد و وجود باند مربوط به هر ژن مشاهده و تایید گردید. نتایج الکتروفورز هر یک از ژن‌ها در شکل ۱ آورده شده است.

محصولات PCR نمونه ها که تعیین توالی آنها توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) انجام شده بود، ابتدا با نرم-افزار Chromas1.45 مورد بررسی و ویرایش قرار گرفت و سپس این توالی با توالی ثبت شده از هفت ژن خانگی مورد نظر در بانک ژن موجود در NCBI مورد بررسی و تایید قرار گرفت. در واقع این ۷ ژن دارای واریانت‌های متفاوتی هستند که این تفاوت سبب شناسایی سویه‌های مختلف باکتری مورد نظر می‌شود. چنانچه واریانتی از هرکدام از این ژن ها شناسایی و در بانک ژن NCBI ثبت شده باشد و توالی به دست آمده با سویه ثبت شده مطابقت داشته باشد، آن سویه در مطالعه براساس کد موجود در بانک ژن، نام برده می‌شود. ولی اگر توالی شناسایی شده با سویه‌های ثبت شده متفاوت باشد، این توالی به‌عنوان توالی یک سویه جدید از باکتری مورد نظر در بانک ژن با کد اختصاصی ثبت می‌گردد. در مطالعه حاضر بررسی توالی با Blast شدن در NCBI نشان داد که ۲۸ ایزوله جمع‌آوری شده قبلا شناسایی شده بودند، لذا سویه جدیدی شناسایی نشد. در پایان، درخت فیلوژنی مربوط به این ۲۸ ایزوله توسط نرم‌افزار Mega v7 با استفاده از روش Neighbour-joining ترسیم گردید. این ترسیم بر اساس روش ماتریکس فاصله طبق مدل UPGAM الگوی سکانس تایپ‌های (ST) به‌دست آمده صورت گرفت. نتایج ترسیم و بررسی درخت فیلوژنی حاصل نشان داد که تمامی ۲۸ ایزوله به‌دست آمده دارای شباهت در الگوی ژنتیکی بوده و برخی از سویه‌ها ۱۰۰درصد شباهت ژنتیکی داشتند. همان‌طورکه در شکل ۲ نشان داده شده است به‌دلیل شباهت ژنتیکی ۱۰۰ درصدی برخی از ایزوله‌ها، ۲۸ ایزوله جمع‌آوری شده مربوط به ۲۱ سویه شناسایی شده از باکتری *S. maltophilia* می‌باشند.



شکل ۱. محصول PCR مربوط به ۷ ژن خانگی در ایزوله های *S. maltophilia*. (A: nuoD) (B: ppsA) (C: mutM) (D: guaA) (E: recA) (F: gapA) (G: atpD) چاهک ladder: مارکر ۱۰۰ bp، -C: کنترل منفی ، +C: کنترل مثبت (*S. maltophilia* تایید شده با PCR)، چاهک‌های ۴-۱: نمونه مجهول که وجود باند مورد نظر را نشان می دهد.



شکل ۲. درخت فیلوژنی سویه‌های شناسایی شده براساس ژن‌های خانگی در باکتری *S. maltophilia*

بررسی پراکندگی ایزوله‌های به‌دست آمده

تعداد ۲۸ ایزوله *S. maltophilia* با روش‌های بیوشیمیایی و تایید ملکولی شناسایی شدند. از این میان ۱۳ ایزوله *S. maltophilia* به‌دست آمده مربوط به نمونه-های محیطی و ۱۵ ایزوله نیز مربوط به نمونه‌های بالینی بودند. از ۱۳ نمونه محیطی ۷ ایزوله (۵۳/۸ ٪) از محیط-های مرطوب به‌دست آمدند و ۶ ایزوله (۴۶/۲ ٪) دیگر مربوط به محیط‌های خشک موجود در بیمارستان‌ها بودند. از ۱۵ ایزوله بالینی نیز، ۱۲ ایزوله (۸۰ ٪) از نمونه خلط بیماران به‌دست آمد و ۳ ایزوله (۲۰ ٪) دیگر در خون بیماران یافت شد، درحالی‌که هیچ ایزوله *S. maltophilia* در نمونه ادرار بیماران یافت نشد. اطلاعات مربوط به محل جمع‌آوری ایزوله‌های شناسایی شده در جدول ۵ آمده است.

بحث

امروزه *S. maltophilia* به‌دلیل افزایش تعداد بیماران دارای نقایص سیستم ایمنی از جمله بیماری ایدز، بیماری‌های زمینه‌ای، سرطان‌ها و در پی آن کموتراپی و رادیوتراپی، گیرندگان پیوند عضو و غیره، طیف وسیعی از

عفونت‌های خطرناک (خون و منتشره، پنومونی، مننژیت، زخم و بافت نرم، چشمی، استئومیلیت و غیره) را ایجاد کرده است (۲, ۸, ۱۴, ۱۹). بنابراین توجه به این باکتری به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. از این‌رو، یافتن منشا آلودگی در بیمارستان‌ها به کمک روش‌های مولکولی، می‌تواند راه‌کارهایی را در جهت جلوگیری از انتقال این باکتری فرصت‌طلب از محیط بیمارستان به بیماران و بالعکس ارائه دهد. در صورت عدم پرداختن به چنین مساله ای، احتمال انتقال این باکتری به بیماران و در نهایت انتقال این باکتری از بیمارستان به جامعه رخ خواهد داد و بدین ترتیب، پراکندگی این باکتری در میان افراد جامعه نیز افزایش خواهد یافت. لذا این مساله اهمیت مطالعه بر روی این موضوع را نشان می دهد.

جدول ۵ . محل جمع‌آوری ایزوله‌های بیمارستانی شناسایی شده *S. maltophilia*

شماره ایزوله	محل نمونه‌گیری	شماره ایزوله	محل نمونه‌گیری
۱	نمونه خلط	۱۵	سینک دستشویی اتاق بیمار
۲	نمونه خلط	۱۶	وسایل و لباس بیمار
۳	نمونه خلط	۱۷	نمونه کست رادیوگرافی
۴	نمونه از کارتکس بیمار	۱۸	نمونه خون
۵	نمونه کست رادیوگرافی	۱۹	نمونه خلط
۶	نمونه از آبخوری بیمارستان	۲۰	سینک دستشویی اتاق بیمار
۷	نمونه از کارتکس بیمار	۲۱	نمونه از آبخوری بیمارستان
۸	نمونه کست رادیوگرافی	۲۲	نمونه خون
۹	نمونه از آبخوری بیمارستان	۲۳	نمونه خلط
۱۰	طی شستشوی بیمارستان	۲۴	نمونه از آبخوری بیمارستان
۱۱	نمونه خلط	۲۵	نمونه خلط
۱۲	نمونه خلط	۲۶	نمونه خلط
۱۳	نمونه خلط	۲۷	نمونه خون
۱۴	نمونه خلط	۲۸	نمونه خلط

آگاهی از الگوی توزیع و ارتباط پاتوژن، این‌که ایزوله‌ها از نظر ژنتیکی تا چه اندازه به هم مربوط می‌باشند و این‌که منشا کلونال سویه‌ها چگونه است، بسیار با اهمیت است. چرا که تعیین اپیدمیولوژی میکروب و عفونت، به طراحی روش‌هائی جهت کنترل پاتوژن کمک فراوان می‌کند. در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی نظیر بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تیپ و نمودار حساسیت به آنتی بیوتیک جهت تعیین تیپ میکروب‌ها استفاده می‌شد. اما با پیشرفت روش‌های مولکولی در دو دهه اخیر، امروزه این روش‌ها در نشان دادن ارتباط دقیق میان سویه‌ها و گونه‌ها بسیار کارآمدتر هستند. اثبات ارتباطات کلون‌های یک پاتوژن این امکان را فراهم می‌کند تا منبع آلودگی (انسان یا محیط) مشخص شده، سویه‌های عفونی از سویه‌های غیرعفونی متمایز شوند و در نهایت عود بیماری از عفونت مجدد تفکیک گردد. تعدادی از عفونت‌ها ناشی از میکروب‌های همزیست می‌باشند، لذا آگاهی از این‌که آیا ایزوله جدا شده از فرد بیمار که سبب عفونت شده، سویه پاتوژن می‌باشد یا سویه همزیست، از اهمیت بالایی برخوردار است. با آگاهی از خصوصیات ملکولی و ژنتیکی میکروب‌ها می‌توان مشخص کرد که فردی که دچار عفونت مجدد شده است، در اثر عود بیماری می‌باشد یا این‌که توسط سویه‌ای غیر از سویه ایجادکننده عفونت اولیه، آلوده شده است. هم‌چنین اگر عفونت ناشی از عود بیماری باشد، این روش‌ها نشان می‌دهند که رژیم درمانی اولیه موثر نبوده و نیاز به درمان جایگزین وجود دارد (۲۰).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اپیدمیولوژی باکتری *S. maltophilia* در میان بیماران بستری و محیط‌های خشک و مرطوب موجود در بیمارستان با استفاده از روش تشخیص ملکولی PCR، بر مبنای شناسایی ۷ ژن خانگی

با درجه تغییرپذیری بالا بوده است. در واقع، ژن‌های خانگی به‌عنوان نشانگرهایی هستند که در طول تاریخ باقی مانده و برای مقایسه سویه‌ها در زمان‌های مختلف و مکان-های جغرافیایی متنوع، مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۱).

در این مطالعه پس از جمع‌آوری نمونه از بیماران بستری و محیط‌های خشک و مرطوب موجود در بیمارستان‌های شهر کرمانشاه، ابتدا به کمک روش‌های تشخیص بیوشیمیایی و سپس بررسی قطعه ژنی 23SrRNA ایزوله‌های *S. maltophilia* از سایر میکروارگانیسم‌های جمع‌آوری شده جداسازی شد، که در نهایت ۲۸ ایزوله *S. maltophilia* شناسایی شد. در مرحله بعد برای شناسایی سویه‌های به‌دست آمد، وجود ۷ ژن خانگی شناخته شد در سویه‌های باکتری مورد نظر با استفاده از روش PCR و سپس تعیین توالی قطعه‌های ژنی مورد مطالعه، بررسی شد. با توالی‌یابی ژن‌های خانگی این امکان فراهم می‌شود تا انواع مختلفی از یک تغییر در پایگاه داده‌های یک ژن تشخیص داده شود (۲۲). در پایگاه آنالیز داده‌ها هر آلل با توجه به اطلاعات قبلی ثبت و شماره گذاری شده است. بنابراین توالی به‌دست آمده از نمونه‌های مورد مطالعه با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک ژن در NCBI مورد بررسی قرار داده شد این بررسی توالی با Blast شدن در NCBI نشان داد که همه ایزوله‌های جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر، قبلا شناسایی شده بودند، لذا سویه جدیدی شناسایی نشد.

در پایان نیز، درخت فیلوژنی توالی مربوطه براساس ژن‌های خانگی بررسی شده، ترسیم شد. نتایج درخت فیلوژنی حاصل نشان داد که تمامی ۲۸ ایزوله به دست آمده دارای شباهت در الگوی ژنتیکی بوده و برخی از سویه‌ها ۱۰۰درصد شباهت ژنتیکی داشتند و ۲۸ ایزوله جمع‌آوری شده مربوط به ۲۱ سویه شناسایی شده از باکتری *S. maltophilia* بودند. این مساله نشان‌دهنده وجود ارتباط ژنتیکی نزدیک میان آن‌هاست و شاید یکی از دلایل این ارتباط منشا جغرافیایی ایزوله‌ها باشدکه همگی از نمونه‌های محیطی و بالینی در شهر کرمانشاه جداسازی شده‌اند. این احتمال وجود دارد که در مطالعات وسیع‌تر و مقایسه ایزوله‌های به‌دست آمده از مناطق مختلف جغرافیایی در سطح کشور، وجود این ارتباط ژنتیکی نزدیک مشاهده نگردد.

در سال۲۰۱۱ مطالعه‌ای پیرامون بررسی ژن‌های بیماری‌زایی در سویه‌های *S. maltophilia* در آلمان انجام شد، که به موجب آن وجود ژن‌های ضروری برای تولید پیلی، فیمبریه و تاژک در ژنوم تمامی ایزوله‌های شناسایی شده این باکتری، گزارش شده بود، که نشان‌دهنده پتانسیل کلی *S. maltophilia* برای گسترش و استقرار بر روی سطوح محیطی و بالینی از جمله میزبان می‌باشد (۲۳). در سال ۲۰۲۰، مطالعه‌ای بر روی ارتباط کلونی بین ایزوله‌های محیطی و بالینی *S. maltophilia* با استفاده از روش ملکولیPFGE (ژل الکتروفورز پالسی) در ایران انجام شد که در آن تنوع ژنتیکی وسیعی در سویه‌های *S. maltophilia* در منابع بالینی و محیطی مشاهده شد. در این مطالعه که نمونه‌گیری بالینی و محیطی از ۳ بیمارستان در تهران انجام شده بود، ۱۲۰ ایزوله بالینی و ۱۵ ایزوله محیطی شناسایی شدند. اشتراک برخی سویه‌ها در میان نمونه‌های بالینی و محیطی داخل بیمارستان نشان‌دهنده وجود یک منبع مشترک برای انتشار *S.maltophilia* بین بخش‌های مختلف بود. بنابراین، این مطالعه انتشار داخل بیمارستانی ایزوله‌های خاصی از *S. maltophilia* را در میان بیماران و محیط نشان داد (۲۴). در مطالعه مشابهی که توسط بوستان قدیری و همکاران در سال ۲۰۱۹، در شهرهای مختلف ایران انجام شد، تعداد ۱۶۴ ایزوله *S. maltophilia* در یک دوره ۱ ساله جداسازی و به کمک روش MLST (ترادف‌یابی چند جایگاهی) شناسایی گردید. این ایزوله‌ها تنها از نمونه‌های بالینی شامل: خلط، خون، مایع مغزی- نخاعی، سپتوم و سواب گلو به‌دست آمده بود، که بیش‌ترین ایزوله به‌ترتیب از خون و خلط جداسازی شده بود (۱۴). پیش از این مطالعه، مطالعه ایزدی آملی و همکاران در سال ۲۰۱۷ نیز تعداد ۲۰ ایزوله *S. maltophilia* از نمونه‌های بالینی مختلف در ایران را شناسایی کرده بود. نمونه‌های بالینی شامل خون، سپتوم، ادرار و مایعات دهانی- دندانی بودند که بیش‌ترین ایزوله به‌ترتیب از خون، سپتوم، ادرار و سپس مایعات دهانی- دندانی به‌دست آمد (۲۵). در یک مطالعه‌ی ۸ ماهه که توسط محققزاده و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش شده است نیز، از مجموع ۱۰۹ ایزوله *S. maltophilia* به‌دست آمده از نمونه‌های بالینی مختلف، ۱۰۱ ایزوله (۹۲/۷ ٪) از نمونه خون و ۸ ایزوله ۷/۷ ٪ از نمونه‌های تنفسی مانند خلط جمع‌آوری شدند (۲۶).

در این مطالعه، از ۲۸ ایزوله *S. maltophilia* که با روش‌های بیوشیمیایی و تایید ملکولی شناسایی شدند، ۱۳ ایزوله *S. maltophilia* به‌دست آمد مربوط به نمونه‌های محیطی (۷ ایزوله (۵۳/۸ ٪) از محیط‌های مرطوب و ۶ ایزوله (۴۶/۲ ٪) از محیط‌های خشک موجود در بیمارستان‌ها) و ۱۵ ایزوله نیز مربوط به نمونه‌های بالینی (۱۲ ایزوله (۸۰٪) از خلط بیماران و ۳ ایزوله (۲۰ ٪) از خون بیماران) بودند (جدول ۵). از میان ایزوله‌های بررسی شده تعداد اندکی سویه مشترک نیز میان نمونه‌های بالینی و محیطی یافت شد. در میان نمونه‌های بالینی بیش‌ترین ایزوله به دست آمده مربوط به نمونه خلط بیماران بوده است که متفاوت از دیگر مطالعات اپیدمیولوژی گزارش شده از ایران می‌باشد. البته تفاوت زمانی و مکانی انجام مطالعه می‌تواند دلیل بر تفاوت در این نتایج باشد. چرا که گزارشات علمی متنوع از نقاط مختلف جهان در مورد این باکتری، نشان دهنده اختصاصیت نسبی سویه‌ها به مکان جغرافیایی مورد مطالعه دارد و وجود سویه‌های مشترک در مکان‌های جغرافیایی مختلف کم‌تر مشاهده شده است. از این میان می‌توان به مطالعه انجام شده توسط Chen و همکاران در سال ۲۰۱۰، برای شناسایی آلل‌های سویه *S. maltophilia* WJ66 به‌دست آمده از بیمار بستری در بخش ICU بیمارستانی در چین، با استفاده از ۷ ژن خانگی اشاره کرد (۲۷). هم‌چنین مطالعه‌ی Madi و همکاران از سال ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۵ در صربستان، که ۴۲ ایزوله باکتری *S. maltophilia* به‌دست آمده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس و ۴۶ ایزوله از بیماران غیرسیستیک فیبروزیس را با استفاده از تکنیک‌های PFGE و MLST جهت تعیین تیپ ایزوله‌ها، مورد بررسی قرار دادند (۹). در مطالعه‌ای که توسط Corlouer و همکاران در فرانسه در سال ۲۰۱۷ انجام شده بود نیز ۸۳ ایزوله از این باکتری شناسایی و جداسازی شدند (۲۸). در تمامی این مطالعات تعداد اندکی سویه مشابه با مطالعات دیگر یافت شده بود و این مساله می‌تواند تائیدی بر اهمیت مکان جغرافیایی بر پراکندگی باکتری *S. maltophilia* باشد.

به‌کارگیری موثر روش‌های ملکولی در شناسایی باکتری‌ها در جهت تشخیص صحیح و جلوگیری از گسترش پاتوژن‌های مقاوم، موجب کاهش نیاز به استفاده از داروها می‌شود. لذا آگهی داشتن از تنوع سویه‌ای باکتری‌ها در پاسخ به داروها نیز در این امر موثر است. هم‌چنان که کنترل عفونت نیز برای بیماران بسیار سودمند است و موجب کاهش میزان مرگ و میر در سرتاسر جهان می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی شباهت ملکولی سویه‌های باکتری *S. maltophilia* در میان بیماران بستری و محیط بیمارستان با استفاده از روش تشخیص ملکولی PCR، بر مبنای شناسایی ۷ ژن خانگی موجود و با درجه تغییرپذیری بالا در این باکتری بوده است. نتایج این مطالعات نشان داد که پراکندگی سویه‌های مختلف این باکتری در میان بیماران و محیط بیمارستان وجود دارد و از آن‌جاکه شباهت ملکولی ۱۰۰ درصدی در میان برخی از ایزوله‌ای به‌دست آمده مشاهده شد، نتیجه گرفته شد که تمام سویه‌های در حال گردش باکتری *S. maltophilia* در شهر کرمانشاه متعلق به یک الگوی ملکولی خاص بوده و از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نمی‌باشند. لذا این مساله احتمال آلودگی بیماران به باکتری را از طریق محیط‌های آلوده بیمارستانی افزایش می‌دهد. بنابراین رعایت بهداشت بیمارستانی برای جلوگیری از انتقال این عامل بیماری‌زا از محیط بیمارستان به بیماران و به‌دنبال آن انتشار در جامعه، از اهمیت بالایی برخوردار است. از آن‌جاکه روش‌های تایپینگ ملکولی به دلیل قدرت بالای افتراق دهی، در مطالعات اپیدمیولوژی عوامل عفونی بسیار موثر است، لذا جهت بررسی جامع روابط خویشاوندی و ارتباط کلونال در باکتری *S. maltophilia* استفاده از روش‌های مولکولی افتراقی با قدرت بالا به‌عنوان روش قابل قبول در کنترل این باکتری نیز پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

از گروه میکروب شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

1. Samonis, G., Karageorgopoulos, D.E, Maraki S, Levis, P., Dimopoulou, D., Spernovasilis, N.A., et 2012. Stenotrophomonas maltophilia infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome. PloS One 7(5): e37375.

2. Brooke, J.S., 2012. Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen. Clinical Microbiology Reviews 25(1): 2-41.
3. Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., 2000. Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50(4): 1563-89.
4. Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A., 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environmental Microbiology 7(11): 1673-85.
5. Hagström, Å., Pinhassi, J., Zweifel, U.L., 2000. Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. Aquatic Microbial Ecology 21(3): 231-44.
6. Looney, W.J,, Narita, M., Mühlemann, K., 2009. Stenotrophomonas maltophilia: an emerging opportunist human pathogen. The Lancet Infectious Diseases 9(5): 312-23.
7. Paez, J.G., Costa, S., 2008. Risk factors associated with mortality of infections caused by Stenotrophomonas maltophilia: a systematic review. Journal of Hospital Infection 70(2): 101-8.
8. Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Zappacosta, R., Petrucci, F., Fiscarelli, E., Rossi, C., 2010. Role of excessive inflammatory response to Stenotrophomonas maltophilia lung infection in DBA/2 mice and implications for cystic fibrosis. Infection and Immunity 78(6): 2466-76.
9. Madi, H., Lukić, J., Vasiljević, Z., Biočanin, M., Kojić, M., Jovčić, B., 2016. Genotypic and phenotypic characterization of Stenotrophomonas maltophilia strains from a pediatric tertiary care hospital in Serbia. PloS One. 11(10): e0165660.
10. Minkwitz, A., Berg, G., 2001. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Clinical Microbiology 39(1): 139-45.
11. Kaiser, S., Biehler, K., Jonas, D., 2009. A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. Journal of Bacteriology 191(9): 2934-43.
12. Adamek, M., Linke, B., Schwartz, T., 2014. Virulence genes in clinical and environmental *Stenotrophomas maltophilia* isolates: a genome sequencing and gene expression approach. Microbial Pathogenesis 67: 20-30.
13. Ferjani, S., Saidani, M., Hamzaoui, Z., Alonso, C.A., Torres, C., Maamar, E., 2017. Community fecal carriage of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Tunisian children. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 87(2): 188-92.
14. Bostanghadiri, N., Ghalavand, Z., Fallah, F., Yadegar, A., Ardebili, A., Tarashi, S., 2019. Characterization of phenotypic and genotypic diversity of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from selected hospitals in Iran. Frontiers in Microbiology 10: 1191.
15. Urwin, R., Maiden, M.C., 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends in Microbiology 11(10): 479-87.
16. Shi, C., Singh, P., Ranieri, M.L., Wiedmann, M., Moreno Switt, A.I., 2015. Molecular methods for serovar determination of Salmonella. Critical Reviews in Microbiology 41(3): 309-25.
17. Almeida, L.A., Araujo, R., 2013. Highlights on molecular identification of closely related species. Infection, Genetics and Evolution 13: 67-75.
18. Lee, K. I., French, N.P., Hara-Kudo, Y., Iyoda, S., Kobayashi, H., Sugita-Konishi, Y., 2011. Multivariate analyses revealed distinctive features differentiating human and cattle isolates of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 in Japan. Journal of Clinical Microbiology 49(4): 1495-500.
19. Falagas, M.E., Kastoris, A.C., Vouloumanou, E.K., Rafailidis, P.I., Kapaskelis, A.M., Dimopoulos, G., 2009. Attributable mortality of Stenotrophomonas maltophilia infections: a systematic review of the literature. Future Microbiology 4(9): 1103-9.
20. Lin, Y.T., Huang, Y.W., Liou, R.S., Chang, Y.C., Yang, T.C., 2014. MacABCsm, an ABC-type tripartite efflux pump of Stenotrophomonas maltophilia involved in drug resistance, oxidative and envelope stress tolerances and biofilm formation. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 69(12): 3221-6.
21. Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., Crandall, K.A., 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. Infection, Genetics and Evolution 16: 38-53.
22. Jolley, K.A., Maiden, M.C., 2014. Using MLST to study bacterial variation: prospects in the genomic era. Future Microbiology 9(5): 623-30.
23. Adamek, M., Overhage, J., Bathe, S., Winter, J., Fischer, R., Schwartz, T., 2011. Genotyping of environmental and clinical Stenotrophomonas maltophilia isolates and their pathogenic potential. PLoS One. 6(11): e27615.
24. Kardan-Yamchi, J., Hajihasani, A., Talebi, M,, Khodaparast, S., Azimi, A., Rahbar, M., 2020. Intra-hospital dissemination of clinical and environmental isolates of Stenotrophomonas maltophilia from Tehran. Letters in Applied Microbiology 72(3): 325-331.
25. Amoli, R.I., Nowroozi, J., Sabokbar, A., Rajabniya, R., 2017. Isolation of Stenotrophomonas maltophilia from clinical samples: An investigation of patterns motility and production of melanin pigment. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 7(9): 826-30.
26. Mohagheghzadeh, N., Hashemizadeh, Z., Khashei, R., Kholdi, S., Mohebi, S., Motamedifar, M., 2020. High occurrence of antibiotic resistance and biofilm-formation among Stenotrophomonas

maltophilia isolated from a tertiary hospital in Southwest of Iran. Gene Reports 21: 100827.
27. Chen, Y., Zhang, Z., Sun, J., Zhao, L., Li, S., 2010. Molecular epidemiology of Stenotrophomonas maltophilia. Chinese Journal of Nosocomiology 20(8): 1062-5.
28. Corlouer, C., Lamy, B., Desroches, M., Ramos-Vivas, J., Mehiri-Zghal, E., Lemenand, O. 2017. *Stenotrophomonas maltophilia* healthcare-associated infections: identification of two main pathogenic genetic backgrounds. Journal of Hospital Infection 96(2): 183-8.