Archive of SID

Avicenna Journal of Clinical Medicine No 87, Volume 25, Issue 1, Spring 2018, Pages: 28-34

Original Article

doi: 10.21859/ajcm.25.1.28

Molecular Detection of Virulence Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Specimens by Multiplex PCR

Afsoon Shariat[1,*], Sajad Alizadeh[2], Mehdi Jahangiri Hoseinabadi[2], Mohammad Movagharnejad[2]

[1] *Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*

[2] *PhD Student, Department of Microbiology School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*

**** Corresponding Author:** Afsoon Shariat, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. Email: afsoonsh1980@yahoo.com*

Received: 30.12.2017
Accepted: 16.04.2018

How to Cite this Article:
Shariat A, Alizadeh S, Jahangiri Hoseinabadi M, Movagharnejad M. Molecular Detection of Virulence Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Specimens by Multiplex PCR. *Avicenna J Clin Med*. 2018; 25(1): 28-34. DOI: 10.21859/ajcm.25.1.28.

Abstract

Background and Objective: *Pseudomonas aeroginosa* is the most common pathogen associated with nosocomial infections and possesses virulence factors which contribute to the bacterial invasion and toxicity such as alginate, exoenzyme S, exotoxin A and elastase. The aim of this study was to determine the prevalence of *algD*, *exoS*, *toxA* and *lasB* genes in *Pseudomonas aeruginosa* samples isolated from patients by Multiplex PCR.

Materials and Methods: In this cross sectional study, sixty clinical samples were collected from Dey and Motahhari Hospitals, Tehran, Iran. Following identification of isolates by biochemical methods, Antibiogram test was performed using disc diffusion method with different antibiotics. Multiplex PCR method was performed to identify the desired genes.

Results: 37 out of 60 (61.66%) male and 23 out of 60 (38.34%) female specimens were positive for *pseudomonas aeruginosa*. The highest level of antibiotic resistance of the *Pseudomonas aeroginosa* isolates was observed against ceftriaxone (93.33%). The prevalence rate of virulence genes among all isolates was as follows; *lasB* (61.7%), *toxA* (60%), *algD* (43.3%) and *exoS* (5%).

Conclusion: Elastase, exotoxin A and alginate are considered important virulence factors of *pseudomonas aeruginosa* and they play a major role in causing diseases and tissue and skin lesions.

Keywords: Genes, Multiplex PCR, *Pseudomonas aeruginosa*

www.SID.ir

Copyright © 2018 Avicenna Journal of Clinical Medicine

Archive of SID

doi: 10.21859/ajcm.25.1.28

مقاله پژوهشی

تشخیص ملکولی ژن‌های بیماری‌زا در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جداشده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR

افسون شریعت[۱،*]، سجاد علیزاده[۲]، مهدی جهانگیری حسین‌آبادی[۲]، محمد موقرنژاد[۲]

[۱] استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

[۲] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

* **نویسنده مسئول:** افسون شریعت، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

ایمیل: afsoonsh1980@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۰۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۱/۲۷

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* رایج‌ترین پاتوژن مرتبط با عفونت‌های بیمارستانی است که دارای فاکتورهای بیماری‌زایی نظیر آلژینات، اگزوآنزیم S، اگزوتوکسین A و الاستاز که در تهاجم و سمیت باکتری مشارکت دارند می‌باشد. در این ارتباط، هدف از مطالعه حاضر شناسایی شیوع ژن‌های *algD*، *exoS*، *toxA* و *lasB* در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از بیماران با روش ملکولی Multiplex PCR (Multiplex Polymerase Chain Reaction) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی ۶۰ نمونه بالینی سودوموناس *آئروژینوزا* از بیمار ستان‌های دی و مطهری تهران جمع‌آوری گردید. پس از تأیید ایزوله‌ها با روش‌های بیوشیمیایی، آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن (Disk Diffusion) با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف انجام شد. علاوه‌براین، واکنش Multiplex PCR جهت شناسایی ژن‌های مورد نظر به کار رفت.

یافته‌ها: از ۶۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۳۷ بیمار مرد (۶۱/۶۶ درصد) و ۲۳ بیمار زن (۳۸/۳۴ درصد) دارای عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* بودند. بیشترین سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* علیه سفتریاکسون (۹۳/۳۳ درصد) مشاهده شد. میزان شیوع ژن‌های بیماری‌زا در ایزوله‌ها نیز عبارت بود از: *lasB* (۶۱/۷ درصد)، *toxA* (۶۰ درصد)، *algD* (۴۳/۳ درصد) و *exoS* (۵ درصد).

نتیجه‌گیری: الاستاز، اگزوتوکسین A و آلژینات فاکتورهای مهم بیماری‌زای *سودوموناس آئروژینوزا* هستند و نقش اصلی را در ایجاد بیماری‌ها و آسیب‌های بافتی و پوستی ایفا می‌کنند.

واژگان کلیدی: ژن‌ها، *سودوموناس آئروژینوزا*، واکنش زنجیره پلیمراز

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا میکروارگانیسمی با قابلیت تحرک، باسیلی شکل، گرم منفی و هوازی اجباری است که به‌وفور در طبیعت حضور دارد و در محیط‌های مرطوب بیمارستانی مستقر می‌شود [۱]. این باکتری از توانایی کلونیزاسیون در افراد طبیعی برخوردار می‌باشد و در زمان مناسب از جمله بیماری‌های دیابت، ابتلا به سرطان و کاهش سطح ایمنی به‌صورت فرصت‌طلب ایجاد عفونت می‌نماید. *سودوموناس آئروژینوزا* عامل بیماری‌زای مهم و منجر به مرگ در مبتلایان به سیستیک فیبروزیس، سوختگی‌های شدید و افراد دارای نقص ایمنی است [۲]. این باکتری قادر به تولید پیگمان‌های مختلف از جمله پیوسیانین، پیووردین، پیوروبین و پیوملانین می‌باشد. بیماری‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* بیشتر توسط عوامل بیماری‌زای پیلی (فیمبریه)، آنزیم‌ها و توکسین‌ها ایجاد می‌شوند. اغلب سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* که از بیماران جداسازی می‌گردند، آنزیم‌های خارج سلولی نظیر الاستاز، پروتئاز و دو نوع همولیزین شامل: فسفولیپاز C حساس به حرارت و یک گلیکولیپید مقاوم به حرارت را تولید می‌کنند [۳،۴]. لیپوپلی‌ساکارید این باکتری نیز نقش مستقیمی در ایجاد تب، شوک، لکوسیتوز، لکوپنی و انعقاد داخل عروقی منتشر دارد. اگزوتوسین A یک پروتئین توکسیک بوده که توسط ژن *toxA* کد شده و موجب اختلال در فاکتور طویل‌کننده EF_2 در مرحله بیوسنتز پروتئین می‌گردد. همچنین، عامل بیماری‌های سیستمیک بوده و به‌عنوان عامل

www.SID.ir

Archive of SID

کمک‌کننده در کلونیزاسیون باکتری محسوب می‌شود [۱]. ژن *algD* نیز سبب سنتز آلژینات می‌گردد و یک فاکتور مهم در عفونت‌های مزمن در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس می‌باشد. شایان ذکر است که اغلب سویه‌های جداسازی‌شده از این بیماران واجد کلونی‌های موکوئیدی می‌باشند که با حضور این ژن ارتباط مستقیمی دارد؛ به‌طوری که محصول این ژن موجب چسبندگی و ایجاد بیوفیلم در باکتری‌ها شده و به پیشرفت بیماری کمک می‌نماید [۴]. از سوی دیگر، اگزوتوکسین S که توسط ژن *exoS* کد می‌شود منجر به مرگ سلول میزبان و تخریب بافت و در نتیجه افزایش پاسخ التهابی و تشدید بیماری در بیماران با عفونت‌های حاد نظیر ذات‌الریه اکتسابی می‌گردد [۵]. ژن *lasB* نیز بیان‌کننده آنزیم الاستاز در پدیده کوروم سنسینگ باکتری دخیل می‌باشد؛ به‌طوری که باعث ارتباط سلول به سلول شده، رونویسی و ترجمه را تحت تأثیر قرار می‌دهد و اطلاعات را مبادله می‌کند. الاستازها به شکل دو آنزیم Las A و Las B می‌باشند که به‌صورت هم‌افزایی وارد عمل شده و منجر به تجزیه الاستین می‌شوند. این مکانیسم آسیبی جدی به بافت‌های دارای الاستین وارد نموده و منجر به آسیب پارانشیمی ریه و ضایعات خونریزی‌دهنده پوست می‌شود [۳]. با توجه به مطالب فوق، هدف از این مطالعه شناسایی ملکولی ژن‌های *algD*، *exoS*، *toxA* و *lasB* دخیل در بیماری‌زایی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و شناسایی سودوموناس آئروژینوزا

در این مطالعه مقطعی که در بازه زمانی مهر ماه تا دی ماه سال ۱۳۹۶ صورت گرفت، تعداد ۶۰ نمونه بالینی شامل: نمونه‌های خون، ادرار، تراشه تنفسی، زخم و سوختگی از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های دی و سوانح سوختگی شهید مطهری شهر تهران جمع‌آوری گردید (جدول ۱). ابتدا نمونه‌های مشکوک به *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری‌شده بر روی محیط‌های بلاد آگار، مک‌کانکی آگار و ستریمید آگار (Merck آلمان) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از این مرحله، نمونه‌ها از نظر شکل کلنی و تغییرات ایجادشده در محیط‌های مورد استفاده بررسی شدند. کلنی‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، آزمون اکسیداز، تحرک، سیمون سیترات، TSI (Triple Sugar Iron)، اوره‌آز، OF (Oxidative Fermentative) (اکسیداسیون- تخمیر)، رشد در ۴۲ درجه سلسیوس و تولید پیگمان در محیط ستریمید آگار مورد تأیید نهایی قرار گرفتند [۶]. شایان ذکر است که به‌منظور انجام آزمون آنتی‌بیوگرام و روش مولکولی از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به‌عنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۱: نمونه‌های بالینی واجد عفونت *سودوموناس آئروژینوزا*

نوع نمونه بالینی	تعداد نمونه	
	مرد	زن
عفونت زخم	۱۳	۷
سوختگی	۱۷	۱۱
عفونت ادراری	۲	۴
عفونت تنفسی	۳	۱
عفونت خون	۲	-
تعداد کل	۳۷	۲۳

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا

برای انجام آزمون آنتی‌بیوگرام با دیسک‌های تجاری مشخص از روش دیسک دیفیوژن مطابق با دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) استفاده شد [۷]. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده شامل: آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) و سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم) تهیه‌شده از شرکت پادتن طب ایران بودند.

استخراج DNA و واکنش Multiplex PCR برای تکثیر ژن‌های algD، exoS، toxA و lasB

جهت استخراج DNA ژنومی نمونه‌ها از کیت تجاری مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران مخصوص باکتری‌های گرم منفی به شماره (Cat No. MBK0041) استفاده شد. توالی اختصاصی پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه (*algD*، *exoS*، *toxA* و *lasB*) پس از انتخاب در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) بلاست گردیده و جهت سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده شد (جدول ۲) [۸]. علاوه‌براین، به‌منظور اندازه‌گیری میزان DNA استخراج‌شده از دستگاه نانودراپ (Bio-Rad آمریکا) استفاده گردید. آزمون Multiplex PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر PCR master mix 2X (سیناکلون، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. برنامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (T100، BIO RAD، آمریکا) شامل: واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل واسرشتگی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های *algD*، *lasB*، *toxA* و *exoS*

ژن	توالی پرایمرها ('۳→'۵)	اندازه محصول (bp)
algD	F: ATGCGAATCAGCATCTTTGGT R: CTACCAGCAGATGCCCTCGGC	۱۳۱۰
lasB	F: GGAATGAACGAAGCGTTCTC R: GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	۳۰۰
toxA	F: GGTAACCAGCTCAGCCACAT R: TGATGTCCAGGTCATGCTTC	۳۵۲
exoS	F: CTTGAAGGGACTCGACAAGG R: TTCAGGTCCGCGTAGTGAAT	۵۰۴

مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. لازم به ذکر است که محصول واکنش Multiplex PCR در آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز گشت و پس از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داک (BIO RAD، آمریکا) مشاهده گردید.

در نهایت، آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 13 و با استفاده از آزمون مربع کای جهت بررسی ارتباط فراوانی ژن‌ها با جنسیت و سن بیماران صورت گرفت. سطح معناداری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

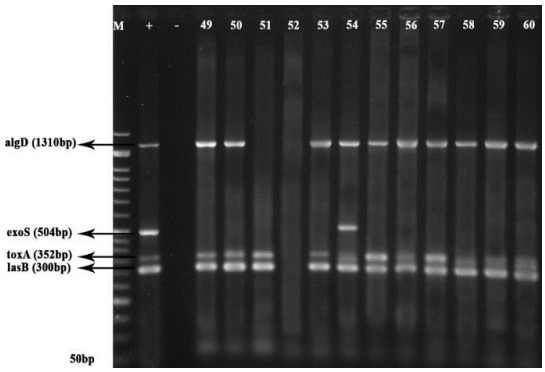
یافته‌ها

از میان ۶۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری‌شده، ۳۷ بیمار (۶۱/۶۶ درصد) مرد و ۲۳ بیمار (۳۸/۳۴ درصد) زن بودند. میانگین سنی بیماران ۳/۵±۴۵ سال بود. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نمونه‌ها نشان داد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون ۵۶ (۹۳/۳۳ درصد) بوده و بیشترین میزان حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم ۵۹ (۹۸/۳۴ درصد) و ایمی‌پنم ۵۸ (۹۶/۶۸ درصد) می‌باشد (جدول ۳).

شکل ۱ نتایج واکنش Multiplex PCR جهت شناسایی ژن‌های *lasB*، *toxA*، *algD* و *exos* در *سودوموناس آئروژینوزا* بر روی ژل آگاروز را نشان می‌دهد. میزان فراوانی ژن‌های *lasB*، *toxA*، *algD* و *exoS* در ۶۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۳۷ (۶۱/۷ درصد)، ۳۶ (۶۰ درصد)، ۲۶ (۴۳/۳ درصد) و ۳ (۵ درصد) به‌دست آمد (جدول ۳)؛ بنابراین می‌توان گفت که بیشترین میزان فراوانی مربوط به ژن‌های *lasB* و *toxA* بوده است؛ در صورتی که کمترین فراوانی از آن ژن *exoS* می‌باشد. علاوه‌براین، نتایج حاکی از آن بودند که بین فراوانی ژن‌ها در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و جنسیت و سن بیماران اختلاف معناداری وجود ندارد (P>۰/۰۵).

جدول ۳: میزان حساسیت ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

نوع آنتی‌بیوتیک	مقاوم (درصد) تعداد	نیمه‌حساس (درصد) تعداد	حساس (درصد) تعداد
ایمی‌پنم	۱ (۱/۶۶)	۱ (۱/۶۶)	۵۸ (۹۶/۶۸)
سفتازیدیم	۵ (۸/۳۴)	-	۵۵ (۹۱/۶۶)
سفتریاکسون	۵۶ (۹۳/۳۳)	۴ (۶/۶۷)	-
سیپروفلوکساسین	۱۱ (۱۸/۳۴)	-	۴۹ (۸۱/۶۶)
مروپنم	۱ (۱/۶۶)	-	۵۹ (۹۸/۳۴)
جنتامایسین	۴ (۶/۶۷)	-	۵۶ (۹۳/۳۳)



شکل ۱: نتایج آزمون Multiplex PCR جهت شناسایی ژن‌های *algD*، *exoS*، *toxA* و *lasB* در ۶۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* بر روی ژل آگاروز
چاهک M: مارکر ۵۰ bp؛ چاهک (+): کنترل مثبت واجد ژن‌های *algD* (۱۳۱۰ bp)، *exoS* (۵۰۴ bp)، *toxA* (۳۵۲ bp) و *lasB* (۳۰۰ bp)؛ چاهک (-): کنترل منفی؛ چاهک‌های ۶۰-۴۹: ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با داشتن فاکتورهای حدت مهمی قادر است در صورت آلوده‌شدن، تشخیص ناصحیح و عدم درمان به‌موقع با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب عفونت‌های پایداری را در افراد ایجاد نماید [۹]. این باکتری از جمله باکتریی‌های مقاوم به دارو در مراکز درمانی و بیمارستانی بوده که موجب بروز پدیده مقاومت چندگانه (MDR: Multi Drug Resistance) به چند آنتی‌بیوتیک مختلف در اثر استفاده نامناسب می‌گردد [۱۰]. باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* دارای عوامل بیماری‌زا مانند آلژینات، اگزوآنزیم S، اگزوتوکسین A و الاستاز بوده که توسط سیستم‌های سیگنال‌دهی خاصی تنظیم می‌شوند [۱۰]. در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن‌های بیماری‌زای *algD*، *exoS*، *toxA* و *lasB* با استفاده از روش ملکولی Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

امینی بزنجانی و همکاران طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ با بررسی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های بالینی گزارش نمودند که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و آموکسی‌سیلین صورت گرفته است و بیشترین میزان حساسیت از آن آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (۸۸/۳ درصد) و سفتازیدیم (۷۰ درصد) می‌باشد [۶]؛ درحالی که در مطالعه حاضر بیشترین مقاومت به سفتریاکسون (۹۳ درصد) و بیشترین حساسیت به مروپنم (۹۸ درصد) و ایمی‌پنم (۹۶ درصد) به‌دست آمد. آمارهای متفاوتی در مورد میزان مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* به پنم‌ها در ایران گزارش شده است. در مطالعه نیک‌بین و همکاران تنها ۲ درصد از ایزوله‌ها به ایمی‌پنم مقاوم بودند [۱۱]؛ درحالی که در پژوهش رنجبر و همکاران ۹۷ درصد از سویه‌ها به پنم‌ها مقاومت داشتند [۱۲]. در اغلب موارد مقاومت به پنم‌ها در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در اثر انتشار سویه‌های مختلف می‌باشد. از آنجایی که در این مطالعه تعداد کمی از ایزوله‌ها به پنم‌ها مقاوم بودند، ممکن است ایزوله‌های بررسی‌شده در این مطالعه متعلق به سویه‌های مشابهی باشند. به‌طور کلی در ایران میزان مقاومت به پنم‌ها در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها کمتر است؛ به‌طوری که می‌توان به کارایی این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های سودوموناسی امیدوار بود [۱۳].

استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی سبب بروز سویه‌های مقاوم شده است [۱۴]. این مقاومت به وسیله القای آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک‌ها و یا موتاسیون در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های غشای خارجی باعث تغییر در گیرنده و یا محل اثر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود [۱۴]. در پژوهشی که واعظ و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ارتباط با نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های مختلف بالینی در اصفهان انجام دادند، سیپروفلوکساسین ۵۳/۷ درصد مقاومت را از خود نشان داد [۱۰]. در پژوهش فاضلی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مورد نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری‌شده از زخم‌های سوختگی نیز ۹۸/۷ درصد مقاومت به سیپروفلوکساسین گزارش شد [۱۵] که نتایج این مطالعات با یافته‌های پژوهش اخیر همخوانی ندارد. این تناقض می‌تواند به دلیل تفاوت در مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداشده از مناطق مختلف باشد. در این راستا، خلجی و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۱۳ میزان حساسیت به سیپروفلوکساسین را ۱۰۰ درصد گزارش نمودند [۱۶]. همچنین در مطالعه آذرگون و همکاران در سال ۲۰۱۳ از میان ۵۱ نمونه *سودوموناس آئروژینوزای* جداسازی‌شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، ۱۵/۷ درصد مقاوم به سیپروفلوکساسین و ۹/۸ درصد مقاوم به سفتازیدیم بودند [۱۷] که نتایج این مطالعات تاحدودی با یافته‌های پژوهش حاضر مشابه می‌باشند؛ بنابراین به نظر می‌رسد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی *سودوموناس آئروژینوزا* می‌تواند از شهری به شهر دیگر و حتی از بیمارستانی به بیمارستان دیگر متفاوت باشد؛ به‌طوری که مقایسه نتایج این پژوهش با سایر مطالعات در ارتباط با نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که میزان بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (۱۸ درصد)، جنتامایسین (۶ درصد) و سفتازیدیم (۸ درصد) به مراتب پایین‌تر از مطالعات پیشین بوده است؛ زیرا مقاومت دارویی *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های بالینی می‌تواند بر حسب زمان و مکان مطالعه متفاوت باشد [۱۸]. علاوه‌براین، این اختلاف می‌تواند از حساسیت دیسک آنتی‌بیوتیکی به‌کاررفته و تفاوت در منبع سویه‌ها ناشی شود. شایان ذکر است که با وجود انجام صحیح روش دیسک دیفیوژن، در اکثر موارد نمی‌توان به نتایج این روش اکتفا نمود و برای تأیید قطعی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها لازم است میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC: Minim Iminhibitory Concentration) نیز تعیین گردد [۱۳].

زارانزا و همکاران در پژوهشی در سال ۲۰۱۳ در ارتباط با *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های ترشحات تنفسی و ادراری، بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آزترونام و ایمی‌پنم گزارش نمودند که این امر با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی ندارد. شایان ذکر است که در پژوهش آن‌ها در مورد تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری مشخص گردید که ۳۹ درصد از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* واجد ژن *algD* (که به‌طور مستقیم در سنتز بیوفیلم و آلژینات مشارکت دارد) می‌باشند [۹]. به‌طور مشابه در پژوهش حاضر نیز حدود ۴۳ درصد از ایزوله‌ها واجد ژن *algD* بودند. در این زمینه، کمالی و همکاران در پژوهشی در سال ۲۰۱۶ با بررسی ۶۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* مشخص نمودند که ۶۲ درصد از نمونه‌ها واجد ژن اگزوتوکسین A می‌باشند [۱۹].

www.SID.ir

Archive of SID

علاوه‌براین، رئوف و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که ۱۰۰ درصد از نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفالکسین و کاربانیسیلین مقاوم بوده‌اند. فراوانی ژن‌های *algD* و *lasB* نیز به میزان ۱۰۰ درصد گزارش گردید [۲۰]. در پژوهشی که توسط ولدبیگی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ارتباط با سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در ایران انجام شد نیز فراوانی ژن‌های *toxA* و *algD* به‌ترتیب معادل ۷۴ و ۹۲ درصد به‌دست آمد [۲۱]. همچنین طی یک بررسی ولسکا و همکاران در سال ۲۰۰۹ عنوان نمودند که ۱۰۰ درصد از نمونه‌های جداسازی‌شده *سودوموناس آئروژینوزا* واجد ژن‌های *algD* و *lasB* می‌باشند [۲۲]. در مطالعه‌ای که نیک‌بین و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ارتباط با سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های عفونی مختلف در ایران انجام دادند نیز تمامی سویه‌ها واجد ژن *lasB* بودند [۱۱]. علاوه‌براین، طی پژوهش صورت‌گرفته توسط دادمنش و همکاران در سال ۲۰۱۴ در ارتباط با عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در بچه‌ها مشخص گردید که بالاترین سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری از آن آمپی‌سیلین (۵۲ درصد) و جنتامایسین (۴۸ درصد) می‌باشد و ژن‌های *exoS* (۷۴ درصد) و *toxA* (۶۹ درصد) بیشترین فراوانی را دارند [۲۳].

فرجی و همکاران نیز در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که شیوع ژن‌های *toxA*، *lasB*، *algD* و *exoS* در بیماران دچار سوختگی به‌ترتیب ۳۷، ۸۲، ۷۰ و ۲۱ درصد بوده است [۲۴]. از سوی دیگر، طی بررسی صورت‌گرفته توسط فدهیل و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مورد سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از انواع نمونه‌های بالینی، شیوع ژن‌های *toxA*، *lasB* و *exoS* حدود ۱۰ درصد گزارش گردید [۲۵]. همچنین، عبدالتواب و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۱۸ در مصر بیان کردند که سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۱۰۰ درصد) دارند و فراوانی ژن‌های حدت *toxA*، *lasB* و *exoS* به‌ترتیب ۹۵، ۹۰ و ۷۰ درصد گزارش گردید [۲۶]. در مطالعه‌ای که عطایی آشتیانی در سال ۲۰۱۶ در ارتباط با بررسی ۵۵ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* در ایزوله‌های بالینی انجام داد نیز میزان فراوانی ژن *toxA* را ۹۴/۵ درصد گزارش نمود و علت فراوانی بالای این ژن در روش مولکولی را حساسیت بیشتر این روش در شناسایی ژن‌های حدت دانست [۲۷]. علاوه‌براین، لانوتی و همکاران در پژوهشی در سال ۲۰۰۴ به این نتیجه رسیدند که فراوانی ژن *lasB* در نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ۱۰۰ درصد بوده است [۸]؛ اما در این مطالعه فراوانی ژن‌های *lasB*، *toxA*، *algD* و *exoS* به‌ترتیب ۶۲، ۶۰، ۴۳ و ۵ درصد به‌دست آمد.

مقایسه نتایج سایر مطالعات با یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که استفاده از روش ملکولی PCR و پرایمرهای با حساسیت بالا می‌تواند در تشخیص به‌موقع و سریع ژن‌های ایجادکننده بیماری در مبتلایان به عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* به کار گرفته شود. شایان ذکر است که در پژوهش اخیر بیشترین فراوانی مربوط به ژن‌های *lasB* (۶۲ درصد)، *toxA* (۶۰ درصد) و *algD* (۴۳ درصد) گزارش شد.

نتیجه‌گیری

در بیماران مبتلا به عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا، ژن‌های حدت بیان‌کننده آنزیم الاستاز، اگزوتوکسین A و آلژینات نقش اصلی را در ایجاد بیماری‌های سیستمیک و آسیب‌های بافتی و پوستی ایفا می‌کنند. *سودوموناس آئروژینوزا* از باکتری‌های فرصت‌طلب بیمارستانی و مقاوم به درمان است که با تغییراتی که در سطح غشای باکتری و ژنوم آن اتفاق می‌افتد، نقش چشمگیری در افزایش میزان مرگ و میر در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها دارد؛ از این رو می‌بایست جوانب احتیاط را در تجویز و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در ارتباط با بیماران مبتلا به عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا رعایت نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی دانشجویی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون می‌باشد که در سال ۱۳۹۶ با هزینه شخصی انجام شده است. بدین‌وسیله از همکاری کارشناسان آزمایشگاه میکروب‌شناسی مرکز درمانی سوانح سوختگی تهران قدردانی می‌شود.

شایان ذکر است که نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

REFERENCES

1. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1994;**60**(10):3739-45. PMID: 7986047
2. Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol*. 2005;**56**(2):309-22. PMID: 15813726 DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x
3. Stonehouse MJ, Cota-Gomez A, Parker SK, Martin WE, Hankin JA, Murphy RC, et al. A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol*. 2002;**46**(3):661-76. PMID: 12410824
4. Najafimosleh M, Rashnotaie S, Ghaznavirad E, Abtahi H, Taleie G. Designing of the specific DNA primers for detection of the exoA, oprL and algD pathogenicity genes for rapid diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Tehran Univ Med J*. 2013;**71**(8):493-501. [Persian]
5. Zhu H, Conibear TC, Bandara R, Aliwarga Y, Stapleton F, Willcox MD. Type III secretion system–associatedtoxins, proteases, serotypes, and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with keratitis. *Curr Eye Res*. 2006;**31**(4):297-306. PMID: 16603462 DOI: 10.1080/02713680500536746
6. Amini Bezanjanii F, Mahmoudi R, Amini K. Study and identification Quorum Sensing (QS) genes of *Pseudomonas*

www.SID.ir

Archive of SID

aeruginosa strains isolated from samples of human clinical by Multiplex PCR and determine antibiotic resistance. *Yafteh*. 2016;**18**(2):38-44. [Persian]
7. Wikler MA. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard: *Clin Lab Stand Inst*. 2006;**26**(3):1-183.
8. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from otherorigins. *J Med Microbiol*. 2004;**53**(1):73-81. PMID: 14663109 DOI: 10.1099/jmm.0.05324-0
9. Zaranza AV, Morais FC, do Carmo MS, de Mendonça Marques A, Andrade-Monteiro C, Ferro TF, et al. Antimicrobial susceptibility, biofilm production and adhesion to HEp-2 cells of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples. *J Biomat Nanobiotechnol*. 2013;**4**(1):98.
10. Vaez H, Faghri J, Nasr Esfahani B, Moghim S, Fazeli H, Sedighi M, et al. Antibiotic resistance patterns and genetic diversity in clinical isolatesof *pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of a referral hospital, Isfahan, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;**8**(8):e20130. PMID: 26468363 DOI: 10.5812/jjm.20130v2
11. Nikbin VS, Aslani MM, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour G. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. *Iran J Microbiol*. 2012;**4**(3):118-23. PMID: 23066485
12. Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. *Acta Med Iran*. 2011;**49**(10):675-9. PMID: 22071644
13. Ahmadi A, Soltanpour MM, Imani Fooladi AA. Prevalency of imipenem-resistant bacterial strains isolated from hospital and accuracy of Iranian imipenem disc product. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2015;**17**(1):61-6. [Persian]
14. López-Causapé C, de Dios-Caballero J, Cobo M, Escribano A, AsensioÓ, Oliver A, et al. Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Spanish multi-centre study. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;**50**(3):334-41. PMID: 28735882 DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.034
15. Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Asadian A, Faghihinia J, Saneeyan H, et al. Detection of morphotyping characteristics identification antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Isfahan Med Sch*. 2012;**29**(171):1-12.
16. Khalaji Y, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Molecular evaluation of antibiotic resistance prevalence in *Pseudomonas aeroginosa* isolated from cockroaches in Southwest Iran. *Int J Med Med Sci*. 2013;**5**(9):420-4.
17. Azargoon R, Doustdar F, Khanbabaei G, Mehrnejad F, Goudarzi H. Type III secretion system characterization of *Pseudomonas aeruginosa* associated with cystic fibrosis. *Res Med*. 2013;**37**(3):189-93. [Persian]
18. Golshani Z, Ahadi AM, Sharifzadeh A. Antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients referring to hospitals. *Arch Hyg Sci*. 2012;**1**(2):48-53. [Persian]
19. Kamali A, Amini K. Concurrent isolation of virulence genes ETA, oprL, gyrB in *Pseudomonas aeruginosa* clinical samples from hospitals in Kerman by Multiplex-PCR. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2016;**18**(3):48-56. [Persian]
20. Ra'oof WaM. Distribution of algD, lasB, pilB and nan1 genes among MDR clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in respect to site of infection. *Tikrit Med J*. 2011;**17**(2):148-60.
21. Valadbeigi H, Sadeghifard N, Rafiei TR, Maleki A. A study on the frequency of toxin A, Alginate genes, and of clinical *Pseudomonas aeroginosa*strains. J Ilam Univ Med Sci. 2011;**20**(1):58-64. [Persian]
22. Wolska K, Szweda P. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Pol J Microbiol*. 2009;**58**(3):255-60. PMID: 19899619
23. Dadmanesh M, Pilehvarzadeh M, Eramabadi M, Eramabadi P, Bagheri Moghadam M, Mashayekhi F. Community acquired *Pseudomonas aeroginosa*urinary tract infections in children hospitalized in a Baqiatallah hospital, Tehran, Iran: Virulence profile and antibiotic resistance properties. *Biosci Biotech Res Asia*. 2014;**11**(2):417-26.
24. Faraji F, Mahzounieh M, Ebrahimi A, Fallah F, Teymournejad O, Lajevardi B. Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. *Microb Pathog*. 2016;**99**:1-4. PMID: 27457974 DOI: 10.1016/j.micpath.2016.07.013
25. Fadhil L, Al-Marzoqi AH, Al Taee ZM, Shalan AA. Molecular and phenotypic study of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa*isolated from various clinical origins by PCR: profiles of genes and toxins. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2016;**7**(1):590-8.
26. Abd El-Tawab AA, El-Hofy F, Khater DF, Al-Adl MM. Virulence, resistance genes detection and sequencing of *gyrA*Gene of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chickens and human in Egypt. *Nat Sci*. 2018;**16**(2):32-9.
27. Ataee-Ashtiani M Z-ST. Molecular detection of the genes gyrB, oprL, ETA, 16SrDNA in *Pseudomonas aeruginosa*strains isolated from clinical samples of Karaj city health centers, Iran. *J Isfahan Med Sch*. 2016;**33**(360):2043-8. [Persian]

www.SID.ir