فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۸، جلد۳، شماره ۱،زمستان ۱۳۸۸،صفحه ۵۹ تا صفحه ۶۵

جداسازی و شناسایی سریع سودوموناس آئروژینوزا از طریق PCR

بهرام امینی[۱]، مهدی کمالی[۲]، علی زارعی محمود آبادی[۳]، ابراهیم بیات[۴]، حمید رضا جوادی[۴]، میثم منصوری[۵]، نیما فرهادی[۶]

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی ، بیمارستان ولی عصر (عج) ، دانشگاه علوم پزشکی زنجان bamini50@yahoo.com
۲- استادیار دانشگاه علوم پزشگی بقیه الله، تهران.
۳- دانشیار دانشگاه علوم پزشگی بقیه الله، تهران.
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران.
۵- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی ، گروه علوم زیستی ، دانشگاه امام حسین، تهران.
۶- کارشناس ارشد سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشگی بقیه الله، تهران.

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۱۷

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت طلبی است که در تمام محیط‌ها قدرت زیست داشته و عامل بسیاری از عفونت های شدید در انسان مانند آندوکاردیت، مننژیت، سپتی سمی و عفونت‌های مزمن ریه در بیماران سیستیک فیبروزیس می‌باشد. اگزوتوکسین A از سمی‌ترین پروتئین‌هایی است که توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید و از طریق ریبوزیله کردن EF-۲ پروتئین سازی در سلول‌های یوکاریوت باعث مهار پروتئین سازی و مرگ سلول می‌شود. هدف از این تحقیق شناسایی دقیق و سریع سودوموناس آئروژینوزا بااستفاده ازروش PCR قبل از بیان پروتئین ها و فاکتورهای ویرولانس است. در این بررسی ۷۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان آیت الله موسوی زنجان جدا و گونه سودوموناس آئروژینوزا از طریق تست های بیوشیمیایی شناسایی شدند. ژنوم باکتری استخراج و شناسایی سودوموناس آئروژینوزا از طریق PCR با موفقیت انجام شد. یک جفت پرایمر اختصاصی از ناحیه ثابت ژن ETA از طریق روش آنالیز بیوانفورماتیک طراحی گردید. حساسیت PCR با پنج گونه مختلف تعیین شد. DNA استافیلوکوکوس اورئوس ، سالونلا پاراتیفیA ، اشیریشیاکلی ، شیگلا و ویبریوکلرا به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. نتایج نشان داد که تنها چهار سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی فاقد ژن اگزوتوکسینA بودند و ٦٦ سویه سودوموناس آئروژینوزا جداشده دارای ژن ETA بودند که حساسیت آزمایش ۹٤/۳ درصد تعیین گردید و نتایج حساسیت برای ۵ گونه باکتری منفی نشان داده شد.

کلید واژه: سودوموناس آئروژینوزا، شناسایی، اگزوتوکسین A، PCR.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا *(Pseudomonas aeruginosa)* باکتری گرم منفی و فرصت طلبی است که از خاک، آب و محیط جدا می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا به عنوان دومین باکتری بیماری‌زای رایج در جراحی‌ها و سومین عامل شایع و متداول عفونت‌های بیمارستانی بعد از اشیریشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس است که حدود ده درصد عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهد (۲۱). بیماران مسن، مبتلایان به لنفوم (Lymphoma)، ایدز (Acquired Immuno Deficiency Syndrome: AIDS)، بیماران شیمی

www.SID.ir

درمانی و بیماران دچار سوختگی، افراد مستعد به عفونت‌های شدید با عامل سودوموناس ائروژینوزا مانند منتژیت (Meningitis)، اندوکاردیت (Endocarditis) و سپتی سمی (Septicemia) می‌باشند (۴،۶،۱۰،۱۶). میزان درصد مرگ و میر افراد مستعد با ایمنی سلولی پایین مانند درصد مرگ ومیر بیماران دچار سوختگی، سرطان و سیستیک فیبروزیس بالا است (۱۳). بررسی‌ای که روی ۱۷۶ بیمار دچار سوختگی در حال درمان در شمال آمریکا انجام شده نشان داده است که گونه‌های مختلف سودوموناس نسبت به درمان آنتی بیوتیکی مقاوم هستند. از نظر اتیولوژی در ۲۵ سال گذشته سودوموناس آئروژینوزا عامل حدود ۷۷ درصد مرگ و میر در بیماران دچار سوختگی می‌باشد (۱،۵). عوامل ویرولانس (Virulence) متنوعی چون توکسین‌ها، آنزیم‌ها، فلاژل، پیلی، لیپوپلی ساکارید، آلژینات و پروتئازها در چسبیدن باکتری به سلول‌های میزبان و بیماریزائی آن نقش دارند. ماهیت طبیعی و اکتسابی این میکروارگانیسم در مقاومت به انواع آنتی بیوتیک‌های جدید و مرگ و میر ناشی از آن باعث شده که محققین به دنبال روش‌های نوین تشخیص سریع باکتری به منظور درمان و جلوگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری باشند (۳).تشخیص باکتری بر مبنای جدا سازی همراه با تست‌های تشخیص افتراقی برای شناسائی باکتری انجام می‌شود به دلیل آن که واکنش متقاطع آنتی ژن بین سودوموناس آئروژینوزا و سایر باکتری‌ها صورت می‌گیرد، پاسخ‌های سرولوژی به آنتی ژن‌های کل سلول نمی‌تواند برای تشخیص به کار برده شوند (۲۰). برای تشخیص این میکروارگانیسم می‌توان از طریق واکنش زنجیره پلیمراز DNA باکتری استفاده نمود. از روش PCR زمانی که استفاده از روش کشت در بیمارانی که نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند، استفاده می‌کنند.کاربرد روش‌های میکروبی و ایمونولوژیکی جهت تشخیص باکتری سودوموناس آئروژینوزا که نیاز به زمان ومواد زیادی می‌باشد، در تشخیص طبی مقرون به صرفه نیست. بنابراین روش PCR یک روش دقیق و سریع جهت تشخیص پاتوژن‌ها حتی در حالت غیر زنده است که باعث کنترل سریع عفونت و کاهش مرگ و میر ناشی از آن می‌شود (۲،۹). اگزوتوکسین A باکتری سودوموناس آئروژینوزا، محصول خارج سلولی است که تقریباً در ۹۵ درصد از سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران تولید می‌شود (۷). ژن اگزوتوکسین A باکتری سودوموناس آئروژینوزا به صورت ثابت روی کروموزوم باکتری قرار دارد (۲۲).در این بررسی ژن اگزوتوکسین A به عنوان هدف جهت تشخیص باکتری سودوموناس آئروژینوزا، از طریق PCR و مقایسه این روش با روش کشت استفاده شد. هدف از این مطالعه، بررسی حساسیت روش PCR و مقایسه آن با روش کشت بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

در این بررسی به مدت یک سال (۱۳۸۸-۱۳۸۷) ۷۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا از بیماران دچار سوختگی نوع دو و سه بستری در بیمارستان آیت الله موسوی زنجان با سوآپ استریل جدا و در محیط نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. سپس باکتری‌ها توسط تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، TSI، تست سیترات، اندول،PV، MR و تولید پیگمان شناسایی و پس از کشت در محیط کشتLB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی ۲۰ درصد) در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردیدند.

طراحی پرایمر

جهت تشخیص سودوموناس آئروژینوزا، ژن اگزوتوکسین A (ETA) بر روی DNA کروموزومی باکتری به عنوان ژن هدف در این بررسی استفاده گردید. این ژن یک ژن ۱۹۱۷ جفت بازی است که توالی نوکلئوتیدی آن از اطلاعات بانک ژنی (GenBank database) استخراج و بخشی از ژن انتخاب و با نرم افزارهای DNASIS و Oligo، پرایمر بالادست

Archive of SID

www.SID.ir

(Forward primer) و پرایمر پایین دست (Reverse primer) طراحی و سنتز (سیناژن، ایران) گردید. توالی‌های پرایمر بالا دست و پایین دست تشخیص سودوموناس آئروژینوزا عبارت بودند از:

PBF: ۵′- TGC TGC ACT ACT CCA TGG TC -۳′

PBR: ۵′- ATC GGT ACC AGC CAG TTC AG -۳′

تخلیص DNA باکتری

سویه‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا در محیط LB-broth به مدت ۱۲ ساعت رشد و ۵ میلی لیتر از کشت ۱۲ ساعته باکتری‌های مورد آزمایش در محیط LB مایع در دورg ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ژنوم کروموزومی باکتری‌ها با استفاده از کیت تخلیص ژنوم High Pure PCR Template (Preparation,Roche) استخراج و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و جهت بررسی کیفیت محصول تخلیص شده DNA ی ژنومی باکتری‌ها روی ژل آگاروز یک در صد الکتروفورز شد. برای اندازه گیری غلظت DNA نیز از دستگاه UV – اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰nm و ۲۸۰nm استفاده گردید.

واکنش PCR جهت شناسایی ژن ETA

برای انجام PCR از آغازگرهای (Primers) طراحی شده برای ژن ETA استفاده گردید. PCR با ۵۰ میکرولیتر مخلوط حاوی ۵ میکرولیتر بافرX۱۰، ۱/۵ میکرولیتر$MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۴ میکرولیتر dNTP (۲/۵ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز ۵) (u/µl، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر(۱۰pm/µl)، ۱ میکرولیتر از نمونه AND (۲۰۰ng/µl) انجام شد. این مخلوط در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفته و با برنامه واسرشتگی (Denaturation) اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با برنامه واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) پرایمرها بهDNA هدف در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن (Extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه دنبال شد. مرحله طویل سازی نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. جهت بررسی محصول PCR، ۵ میکرولیتر از آن را جهت الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲ درصد انتقال داده،سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین میزان حساسیت واکنش PCR

برای تعیین حساسیت واکنش PCR ژنوم پنج باکتری شامل سویه‌های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا پارا تیفی A، شیگلا و ویبریوکلرا استخراج و PCR انجام شد. جهت بررسی محصول ۵ PCR میکرولیتر از آن روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نمونه‌ها

از تعداد ۷۰ سویه باکتری تحت عنوان سودوموناس آئروژینوزا، ۷۷/۱ درصد (۵۴ سویه) از باکتری‌ها مربوط به بیماران دچار سوختگی نوع دو و ۲۲/۹ درصد (۱۶ سویه) مربوط به بیماران دچار سوختگی نوع سه بودند.

پرایمرها و واکنش PCR

بعد از آنالیز کل توالی نوکلئوتیدی ژن ETA سودوموناس آئروژینوزا در بانک اطلاعات ژنی (GenBank) با استفاده از نرم افزارهای DNASIS و Oligo طول ژن ETA از ۳۹۰- ۲۰۰ به عنوان توالی شناسایی بر اساس اختصاصی بودن انتخاب گردید. این توالی با همه توالی نوکلئوتیدهای بانک اطلاعات ژنی مقایسه و اثبات گردید که دارای بالاترین اختصاصیت است.در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا وجود قطعه ۱۹۰ جفت بازی مربوط به تکثیر بخشی از ژن ETA در باکتری سودوموناس آئروژینوزامشخص شد (شکل ۱). از ۷۰ سویه جدا شده از بیماران دچار سوختگی ۶۶ سویه در واکنش PCR یک قطعه ۱۹۰ جفت بازی ایجاد کردند که ۵۱ و ۱۵ سویه آن به ترتیب مربوط به بیماران دچار سوختگی نوع دو و سه بودند و تنها ۴ سویه منفی بود که ۳ سویه مربوط به سوختگی نوع دو و ۱ سویه مربوط به سوختگی نوع سه بود. علت منفی بودن ۴ سویه می‌تواند

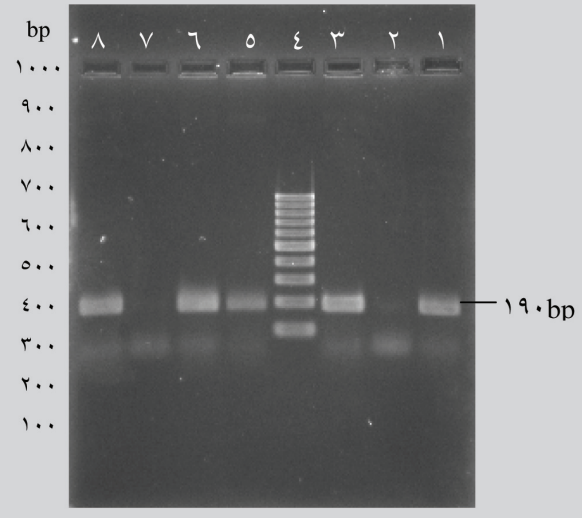
Archive of SID

www.SID.ir

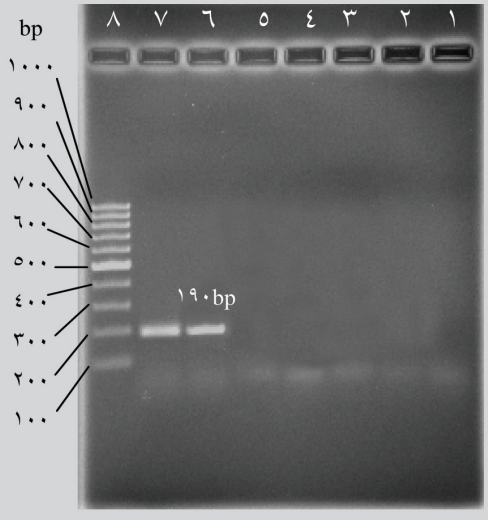
مربوط به عدم وجود ژن مورد نظر بر روی کروموزوم باکتری باشد. همان طور که ذکر شد بیش از ۹۵ درصد سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن ETAهستند. این قطعه نشان دهنده وجود ژن ETA است که ویژه باکتری سودوموناس آئروژینوزا بوده و در سایر باکتری‌ها وجود ندارد. نمونه‌هایی که در ستون‌های ۱، ۳، ۴، ۶ شکل ۱ قرار دارند در تشخیص مولکولی به عنوان گونه سودوموناس آئروژینوزا تعیین هویت شدند.

بهینه سازی واکنش PCR

در این بررسی غلظت مواد مورد نیاز برای واکنش PCR بهینه سازی گردید. در غلظت‌های ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ و ۲ میلی مولار dNTP بهترین بازده محصول واکنش PCR را برای ۳۰ چرخه نشان داد. بهترین دما برای واکنش PCR واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه تعیین (شکل ۲) و تنها سویه سودوموناس آئروژینوزا یک قطعه ۱۹۰ جفت بازی را ایجاد نمود.



شکل ۱ -الکتروفورز محصول PCR ژن ETA سودوموناس آئروژینوزا.
۳،۱) محصول PCR سویه‌های مثبت در سوختگی نوع دو ۲) محصول PCR سویه منفی در سوختگی نوع دو ۴) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی ۸، ۵،۶) محصول PCR سویه‌های مثبت در سوختگی نوع سه ۷) محصول PCR سویه منفی در سوختگی نوع سه



شکل ۲ -الکتروفورز محصول PCR تعیین حساسیت پرایمرهای ژن ETA سودوموناس آئروژینوزا در هفت گونه باکتری.
۱) استافیلوکوک اورئوس (-) ۲) اشریشیاکلی (-) ۳) سالمونلا پارا تیفی ۴ (-) A) شیگلا (-) ۵) ویبریوکلرا (-)۶) سودوموناس آئروژینوزا سوختگی نوع دو (+) ۷) سودوموناس آئروژینوزا سوختگی نوع سه (+) ۸) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی.

www.SID.ir

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم و جدی در عفونت‌های بیمارستانی، در مرگ و میر مبتلایان به لوسمی (لنفوم)، سوختگی‌های شدید و بیماران دچار سیستیک فیبروزیس می‌باشد. این باکتری به تنهایی ۳۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی را به علت مقاومت آنتی بیوتیکی به خود اختصاص داده و با افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی این میزان افزایش یافته است. هر چند تشخیص سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از چند تست در آزمایشگاه امکان پذیر است ولی گاهی کلونیزه شدن زخم سوخته با سودوموناس از یک سو و فقدان پاسخ نوتروفیلیک مناسب به تهاجم بافتی، بیمار را به فاز باکتریمی و سپتی سمی می‌برد که سریعاً منجر به مرگ بیمار می‌شود (۸،۱۲). روش‌های اولیه شناسایی سودوموناس آئروژینوزا بیشتر بر مبنای خصوصیات فنوتیپی هستند و محصولات ژنی را شناسایی نمی‌کنند. این روش‌ها شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی ژنی است. از آن جا که این خصوصیات می‌توانند با تغییر شرایط خارجی، مرحله رشد و جهش‌های ژنتیکی تصادفی تغییر پیدا کنند، استفاده از آزمون‌های فنوتیپی گاه منجر به اخذ نتایج کاذب می‌شود (۱۸). روش‌های میکروبیولوژی موجود مبنی بر رشد روی محیط کشت به دنبال جدا سازی، آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی است. با این حال ردیابی این باکتری در نمونه‌ها با روش‌های استاندارد نیز مشکل و وقت‌گیر و حداقل ۴-۳ روز برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا نیاز است. روش‌های ایمونولوژیکی نیز از حساسیت کافی برخوردار نیست در حالی که در صورت بروز برخی از موارد آلودگی به عملکرد فوری نیاز است. به علاوه این روش‌ها ممکن است در صورت آلودگی نمونه با مقدار زیاد باکتری‌های دیگر به علت تداخل در رشد سودوموناس آئروژینوزا منجر به ایجاد نتایج منفی شود (۱۷،۱۸). به دنبال پیشرفت‌های جدید در روش‌های ژنتیک مولکولی، روش‌هایی که ژن‌های منحصر به فردی را در سودوموناس آئروژینوزا نشانه می‌گیرند، طراحی شده و سودوموناس آئروژینوزا را از سایر گونه‌ها متمایز می‌کنند. این روش‌ها بسیار دقیق تر هستند و کمتر نسبت به روش‌های فنوتیپی به تغییرات محیطی تحت تاثیر قرار می‌گیرند. در سال ۲۰۰۴ بررسی‌های PCR روی سودوموناس آئروژینوزا توسط Karpati و همکاران بر روی بیماران و مقایسه آن با روش کشت آغاز شد که حساسیت آن ۹۳ درصد گزارش گردید. در سال ۲۰۰۵ نیز سودوموناس آئروژینوزا از طریق PCR توسط Stranders و همکاران از بیماران دچار سیستیک فیبروزیس شناسایی گردید (۱۵). در این بررسی نمونه‌ها پس از جدا شدن از بیماران دچار سوختگی از طریق روش‌های بیوشیمیایی تشخیص و در ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند. فاکتورهای زیادی مثل حضور بازدارنده‌های PCR در نمونه، شناسایی سلول‌های زنده و غیره زنده، اختصاصیت آغازگر، شناسایی مستقیم یا استفاده از مراحل غنی کننده می‌توانند، حساسیت یک روش شناسایی PCR را، تحت تاثیر قرار دهند. هدف اصلی در تمام موارد، بهبود حساسیت PCR در شناسایی باکتری بیماریزا است، اما بیشترین اطلاعات گزارش شده به اختصاصیت و حساسیت آغازگر برمی‌گردد. بسیاری از تحقیقات بر مبنای PCR که روی سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفته است بر اساس ردیابی ژن‌های ویرولانس (Virulence) و ژن‌های کد کننده پروتئین‌های سطحی که عامل تهاجم می‌باشد، بوده است. ژن ETA در تمام سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به صورت ثابت باقی مانده است (۱۴). به دلایل اشاره شده در این بررسی از ژن ETA استفاده گردید. آغازگرهای مختلفی برای نواحی مختلف این ژن طراحی شده بود. از بین آن‌ها آغازگری انتخاب شد که بالاترین اختصاصیت را داشت. این آغازگر پس از BLAST تمام آغازگرهای انتخاب شده برای این ژن انتخاب شد. در این تحقیق ۷۰ مورد کشت مثبت سودوموناس آئروژینوزا را نشان دادند که PCR توانست ۶۶ مورد را به درستی شناسایی کند علت منفی بودن ۴ تا از نمونه‌ها، با وجود کشت مثبت نمونه‌ها، می‌تواند به علت عدم وجود ژن ETA بر روی DNA

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری باشد چون بیش از ۹۵ درصد سویه‌های باکتری دارای ژن ETA هستند به این دلیل باکتری‌های فاقد ژن فوق از طریق PCR شناسایی نشدند (۱۱،۱۹). مقایسه بین نتایج کشت و PCR نشان می‌دهد که حساسیت، دقت و اختصاصیت روش PCR بسیار بیشتر از روش کشت است. در روش PCR ژنوم میکروارگانیسم مورد نظر ردیابی و احتمال ردیابی ارگانیسم غیرفعال یا مرده نیز وجود دارد. اما روش کشت بر مبنای شناسایی ارگانیسم زنده است. نتایج حاصل از این بررسی حساسیت تشخیص سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا را در سوختگی نوع دو و سه را ۹۴/۳ نشان داد که با نتایج گزارش شده یکسان بود.

منابع

1. Aziz, J., Abdolvahab, A., Mehdi, K., Jalil, N., Masumeh, H., Shohreh, F. (2006). Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in the south of iran. J Burns, 32, 343-347.

2. Bassler, H.A., Flood, S.A., Livak, K.L. (1995). Use of a fluorogenic probe in a PCR-bassed assay for the detection of listeria monocytogenes. Appl Environ Microbiol, 61,3724-3728.

3. Bitter, W. (2003). Secretins of Pseudomonas aeruginosa: large holes in the outer membrane. Microbiol, 179, 307-314.

4. Driscoll, J.A., Brody, S.L., Kollef, M.H., (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. J Drugs, 67,351-368.

5. Edward, E.T., Heather, A.S., Robert, R., Robert, E.B., Sarvesh, L. (2004). *Pseudomonas* infections in the thermally injured patient. J Burns, 30, 3-26.

6. Gomez, M.I., Prince, A. (2007). Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. Pharmacol, 7, 244-251.

7. Gray, G.L., Smith, D.H., Baldridge, J.S. (1984). Cloning, nucleuotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 81, 2645-2649.

8. Kolak, J., Van Saene, H.K., Dela Cal, M.A. (2005). Control of bacterial *pneumonia* during mechanical ventilation. Croat Med J, 46, 183-196.

9. Lyon, W.J. (2001). TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1,O139, non-O1 and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. Appl Environ Microbiol, 67,4685-4693.

10. Philipp, W., Ursula, E.B. (2009). *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anticancer agent. J Med Microbiol, 299, 161-176.

11. Qin, X., Emerson, J., Stapp, L., Abe, P., Burns, J.L. (2003). Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram- negative bacilli from patients with cystic fibrosis. J chin Microbiol, 41, 4312-4317.

12. Rossolini, G.M., Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect, 11, 17-32.

13. Rowe, S.M., Miller, S., Sorscher, E.J. (2005). Cystic fibrosis. J Med, 352, 1992-2001.

14. Silva Filho, L.V., Tateno, A.F., Velloso, L.F., Levi, J.E., Fernandes, S., Bento, C.N and et al, (2004). Identification of *Pseudomonas aeruginosa,* Burkholderia cepacia complex, and Stenotrophomonas maltophilia in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex

Archive of SID

www.SID.ir

PCR. Pediatr Pulmonol, 37,537– 547.

15. Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., LiPuma, J.J. (2004). PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol, 42,2074-2079.

16. Steinstraesser, L., Oezdogan, Y., Wang, S.C., Steinau, H.U. (2004). Host defense peptides in burns. Burns, 30, 619-627.

17. Xinglong, X., Jingwei, Z., Jun, G., Yanping, P., Yigang, Y., Xiaoquan,Y. and et al. (2008). Rapid detection of *Pseudomonas aerngi-nosa* by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targeting ETA gene. Chin J Biotech, 24, 581-585.

18. Tramper-Strandersa, G.A., Van der Enta, C.K., Wolfs, T.F. (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. J Cystic Fibrosis, 4, 37- 43.

19. Xu, J., Moore, J.E., Murphy, P.G., Millar, B.C., Elborn, J.S. (2004). Early detection of *Pseudomonas aeruginosa* comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). Ann Clin Microbiol Antimicrob, 3,21-31.

20. Yang, A.P., Huang, J.L. (2003). Comparison of McAb ELISA kit and PCR method used to detect *Salmonella* rapidly. Vet Med, 35, 21-22.

21. Yvon, M.B., Christine, B. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim, 84, 499-510.

22. Zhang, W., Li, W., Zhang, W.W. (2005). The methodological study on rapid identification of *Pseudomonas aeruginasa* based on PCR technique. Chin J Health Lab Technol, 2005,1065-1067.

Archive of SID

www.SID.ir