

مطالعه وجود فاکتورهای ویروالانس (الاستاز و فسفولیپاز) و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی در

سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی

محیا رهبر زارع، فاطمه نوربخش*، سحر هنرمند جهرمی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران

چکیده

سابقه و هدف:

سودوموناس آئروژینوزا یکی از پاتوژن های مهم در ایجاد عفونت های اکتسابی از بیمارستان در سراسر جهان می باشد. این باکتری دارای ژن های ویروالانس متعددی است که در بیماری زایی و عفونت نقش مهمی دارند. هدف از انجام تحقیق، شناسایی ژن های ویروالانس، *lasB*، *plcN*، *plcH* در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های انسانی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بوده است.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه ناشی از سوختگی پوست در سال ۱۳۹۵ انجام گردید. آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار انجام شد. DNA ژنومی سویه ها استخراج گردید و واکنش Multiplex-PCR برای تعیین فراوانی هر یک از ژن ها انجام شد.

یافته ها: محدوده سنی افراد مورد مطالعه ۹۰-۲۰ سال می باشد. ۴۶ بیمار مرد و ۵۴ بیمار را زنان تشکیل دادند. ژن های *plcN*، *plcH* با فراوانی ۹۸ درصد و فراوانی ژن *lasB* به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفوکسیتین و آمپی سیلین به ترتیب با فراوانی ۹۶ درصد و ۹۳ درصد مشاهده شد.

نتیجه گیری: فراوانی بالای ژن های *plcN*، *plcH*، *lasB* در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های پوستی حاصل از سوختگی نشان می دهد که این ژن ها به عنوان فاکتورهای مهم ویروالانس در عفونت های حاصل از سوختگی می باشد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، ژن های *lasB*، *plcH*، *plcN*

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیلی گرم منفی، هوازی اجباری، متحرک و فاقد اسپور بوده که به صورت ساپروفیت در محیط وجود دارد (۱). این ارگانیزم یک پاتوژن فرصت طلب است و تنها هنگامی به صورت عامل بیماری زا عمل می کند که در عملکرد

طبیعی سیستم ایمنی نقضی وجود داشته باشد (۵،۴). مهم ترین عوامل ویروالانس سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از: پیوسیانین، همولیزین، الاستاز، تشکیل بیوفیلم که به گسترش بافتی و مقاومت آن در برابر آنتی بیوتیک ها کمک می کند و ریشه کنی عفونت در اثر این باکتری بسیار دشوار می باشد (۶،۱۰،۱۱). دارا بودن فاکتورهای ویروالانس متعدد و مقاومت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها، مواد ضد عفونی کننده و گندزداها کلید موفقیت و ماندگاری این ارگانیزم در محیط و بیماری زایی می باشد (۱۳). مقاومت در این ارگانیزم می تواند با منشاء کروموزوم (ذاتی) و یا پلاسمید (اکتسابی) باشد که در این حالت به سهولت در بین سویه ها و گونه های مختلف حتی بین جنس های مختلف

نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران
پست الکترونیکی: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

ترکیب خوبی در سطح سویه ارائه می دهند، به کارگیری هر دو روش در کارهای تحقیقاتی قدرت تمایز آن ها را نسبت به زمانی- که هر یک از روش ها به تنهایی استفاده می شوند افزایش می دهند. در حالی که توالی های ERIC, REP رایج ترین اهداف مورد استفاده جهت طبقه بندی DNA می باشند یکی از توالی های تکرار شوند BOX⁴ می باشد که برای اولین بار در تمایز استرپتوکوک پنومینه استفاده شده است (۲۶).

در تحقیق های بعدی مشخص شد که این آزمایش های در باکتری سودوموناس آئروژینوزا نیز برای تمایز سویه ها قابل انجام است. سودوموناس آئروژینوزا به طور ژنتیکی نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاومت پیدا می کند، به طوری که باکتری با ایجاد تغییرهایی در پروتئین های غشاء خارجی موجب کاهش نفوذپذیری این غشاء نسبت به آنتی بیوتیک ها می شود. هم چنین با ایجاد تغییرهایی در آنزیم های باکتری موجب افزایش مقاومت باکتری نسبت به آنتی-بیوتیک ها می گردد (۱۹،۲۲). لذا هدف از انجام تحقیق، جداسازی مولکولی هم زمان ژن های ویروالانس *lasB* و *plcH* و *plcN* در نمونه های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از نمونه های بالینی با روش Multiplex-PCR و تعیین و مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بوده است.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی باکتری

در این مطالعه توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۵ انجام شد. تعداد ۱۶۵ نمونه از عفونت ناشی از سوختگی پوست از بیماران با محدوده سنی ۹۰-۲۰ سال از مرکز سوانح سوختگی تهران جمع آوری شد. تمامی نمونه ها به آزمایشگاه تحقیقاتی و پژوهشی گروه میکروبی شناسی پاسارگاد منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه های به دست آمده بر روی محیط بلاد آگار، مک کانکی و ستریمید آگار (مرک، آلمان) کشت داده و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت از نظر تشکیل کلنی و رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تأیید کلنی های رشد یافته مشکوک به سودوموناس آئروژینوزا از آزمایش های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر؛ رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، سیترات، TSI، اندول، متیل رد و ووگس پروسکوئر (MR-VP)، اوره آز، تست OF (اکسیداسیون-تخمیر)، رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد و تولید پیگمان در محیط ستریمید

باکتریایی به صورت افقی منتقل می شود (۱۵،۱۶). الاستازها به شکل دو آنزیم *lasA* و *lasB* می باشند که به صورت سینرژیسیم عمل نموده و الاستین را تجزیه می کنند. این ژن ها در سودوموناس آئروژینوزا توسط کروم سنسینگ کنترل و بیان می شوند که حساسیت جمعیتی در باکتری را به عهده داشته به طوری که ارتباط سلول به سلول بر عهده این ژن ها می باشد و رونویسی و ترجمه را تحت تأثیر قرار داده و اطلاعات را مبادله می کند و در بیماری زائی این باکتری نقش مؤثر دارند. این عمل سبب آسیب به بافت های دارای الاستین شده و در نتیجه منجر به آسیب پارانشیمی ریه و ضایعه های خونریزی دهنده پوست می شوند. عفونت های مزمن سودوموناسی به وسیله تشکیل آنتی بادی-هایی علیه *lasA* و *lasB* و رسوب کمپلکس های ایمنی در بافت های عفونی، مشخص می شوند (۱۸،۱۹،۲۱). سودوموناس آئروژینوزا دو نوع همولیزین تولید می کند: فسفولیپاز C (PLC) که حساس به حرارت است و رامنولیپید مقاوم به حرارت می باشد. ژن های *plcH* و *plcN* فسفولیپاز C را تولید می کنند و فسفولیپاز C فسفولیپید را هیدرولیز می کند. فسفولیپاز C و رامنولیپید، همولیزین های تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا هستند که به طور سینرژیسیم لیپیدها و لکتین را تخریب می کنند. هر دو همولیزین به واسطه خاصیت سیتوتوکسیک شان درتهاجم بافتی شرکت دارند. اعتقاد بر این است که رامنولیپید با حل کردن فسفولیپیدهای غشاء سلول های ریوی امکان دستیابی فسفولیپاز C را به آن ها فراهم می سازد. هم چنین رامنولیپید عملکرد طبیعی سلول های مژکدار اپی تلیال تنفسی انسان را مهار می کند (۲۱). از عناصر تکراری کوتاه^۲ که در بین انتروباکتريا سه ها کشف شدند عناصر تکراری کوتاه بین ژنومی پیوسته می باشد (Enterobacteria repetitive intergenic consensus) که از ۶۹-۱۲۷ جفت باز در طول متغیر می باشد و سکانس ها یا توالی های پالیندرومیک بزرگی را در مرکز محافظت می کنند در تعیین توالی ژنوم *E. coli*، ۳۱۴ توالی REP و ۱۹ توالی ERIC کشف شد. تکثیر REP یا ERIC را می توان به وسیله دو پرایمر تکی، یک مجموعه از پرایمرها و یا مجموعه های متعددی از پرایمر ها انجام داد، الگوهای اریک به طور معمول پیچیدگی کمتری نسبت به الگوهای REP دارند ولی هر دو

سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طولی سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. در پایان، محصول‌های واکنش multiplex-pcr در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵μg/ml) در مقایسه با سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن‌های مورد نظر الکتروفورز گردید.

جدول ۱: توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌ها

اندازه محصول (bp)	توالی پرایمرها (۵'→۳')	ژن
۶۰۸	F= GCACGTGGTCATCCTGATGC R= TCCGTAGGCGTCGACGTAC	<i>plcH</i>
۲۸۴	F= GGAATGAACGAAGCGTTCTC R= TGGCGTCGACGAACACCTC	<i>lasB</i>
۴۸۱	F= TCCGTTATCGCAACCAGCCCT R= AGGTGCAACACCTGGAACAC	<i>plcN</i>

ERIC PCR

در این مطالعه جهت بررسی تکراری نبودن نمونه‌ها و همچنین جهت تعیین الگوی سویه‌های باکتری‌های جدا شده از آزمون ERIC PCR استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق شامل پرایمر رفت ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC و پرایمر برگشت AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG بود. این واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل (۱۲/۵ میکرولیتر PCR master mix 2X) ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به (غلظت ۰/۸ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل تهیه در برنامه زمانی زیر انجام شد: واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طولی سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. در پایان، محصول‌های واکنش multiplex-pcr در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵μg/ml) در مقایسه با سویه

آگار (مرک، آلمان) استفاده شد (۱۸). در این مطالعه از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به‌عنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام)

بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا با آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام گردید (۷). تعدادی از کلونی باکتری را به‌وسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیده و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید. جهت انجام این آزمون دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین (Fox) ۳۰ mg، ایمپنم (IMP) ۳۰ mg، جنتامیسین (GM) ۱۰ mg، آمپی‌سیلین (AM) ۱۰ mg، سولفومتوکسازول (STX) ۳۰ mg، سیپروفلوکساسین (CP) ۳۰ mg، تتراسایکلین (T) ۳۰ mg، آزترئونام (AZT) ۳۰ mg تهیه شده از پادتن طب استفاده شد.

تکثیر ژن‌های ویروالانس

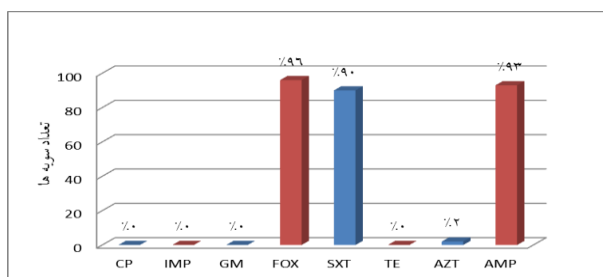
به‌منظور تکثیر ژن‌های ویروالانس، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از کیت Molecular Biological System Transfer (شرکت سیناژن، ایران) استخراج گردید. برای تکثیر ژن‌های از توالی‌های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد که از مقاله (۱۶) استفاده گردید. جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. در نهایت، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR master mix 2X (۱ واحد آنزیم Tag DNA polymerase و ۴۰۰ میکرومول از هر کدام از dNTPs) (سیناکلون، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به (غلظت ۰/۸ میکرومولار)، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۲/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل تهیه و با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (پندورف، آلمان) بدین صورت انجام پذیرفت: واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه

نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا، همه نمونه‌ها دارای ژن *lasB*, *plcH*, *plcN* می‌باشند.

استاندارد سودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن‌های مورد نظر الکتروفورز گردید.

نتایج آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن:

در نمونه‌های اخذ شده بیش‌ترین میزان مقاومت مربوط به آنتی-بیوتیک‌های سفوکسیتین و آمپی‌سیلین به ترتیب ۹۶ و ۹۳ درصد بوده و سپس مقاومت به میزان ۹۰ درصد نسبت به سولفومتوکسازول مشاهده گردید (نمودار ۱) (جدول ۲).



نمودار ۱- توزیع فراوانی میزان مقاومت کلیه سویه‌های نسبت آنتی‌بیوتیک‌ها

جدول ۲: میزان حساسیت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر حسب تعداد و درصد

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت Resistance	حساسیت متوسط Intermediate	میزان حساسیت Sensitive
سیپروفلوکساسین	-	۱ (٪۱)	۹۹ (٪۹۹)
ایچی پنم	-	۱ (٪۱)	۹۹ (٪۹۹)
جنتامیسین	-	-	۱۰۰ (٪۱۰۰)
سفوکسیتین	۹۶ (٪۹۶)	۴ (٪۴)	-
تری‌متوپریم-سولفومتوکسازول	۹۰ (٪۹۰)	۱۰ (٪۱۰)	-
تتراسایکلین	-	-	۱۰۰ (٪۱۰۰)
آزترئونام	۲ (٪۲)	-	۹۸ (٪۹۸)
آمپی‌سیلین	۹۳ (٪۹۳)	۷ (٪۷)	-

نتایج حاصل از ERIC PCR

نتایج به‌دست آمده توسط نرم افزار genAlex آنالیز گردید. اکثر ایزوله‌ها دارای ۵ الگوی بانندی در نواحی ۳۰۰۰ bp، ۱۵۰۰ bp، ۱۰۰۰ bp، ۵۰۰ bp و ۱۰۰ bp بودند. نمونه‌هایی که در یک گروه قرار دارند دارای شباهت ژنتیکی بالای ۹۵٪ می‌باشند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و ترسیم دندروگرام بر اساس شباهت‌های ژنتیکی، نمونه‌های مورد مطالعه را به هشت گروه مجزا تفکیک نموده است که

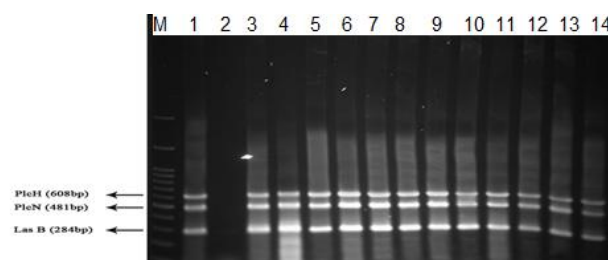
یافته‌ها

ویژگی نمونه‌های مورد مطالعه و جداسازی باکتری

در مطالعه حاضر محدوده سنی افراد تحت مطالعه بین ۲۰ الی ۹۰ سال بوده است. نمونه‌ها از گروه‌های مختلف سنی شامل؛ ۲۰-۳۰ سال (تعداد: ۲ نفر)، ۳۰-۴۰ سال (تعداد: ۸ نفر)، ۴۰-۵۰ سال (تعداد: ۱۶ نفر) و افراد بیش‌تر از ۵۰ سال (تعداد: ۷۴ نفر جمع آوری گردید. (۴۶٪) مرد و (۵۴٪) بیمار را زنان تشکیل می‌دادند.

تکثیر ژن‌های ویروانس با روش Multiplex-PCR

نتایج حاصل از آزمون Multiplex-PCR به‌منظور تکثیر ژن‌های ویروانس *lasB*, *plcH*, *plcN* بر روی تمامی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که در این بررسی بیش‌ترین میزان فراوانی در بین نمونه‌ها مربوط به ژن *lasB* به میزان ۱۰۰ درصد بوده است و ژن‌های *plcH*, *plcN* به میزان ۹۸ درصد وجود داشت. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول‌های multiplex-PCR در تصویر ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱: نتایج واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های ویروانس، راهک M-مارکر ۱۰۰ bp (فرمتاز)، راهک ۱- کنترل مثبت، ۲- کنترل منفی، راهک‌های ۳-۱۴

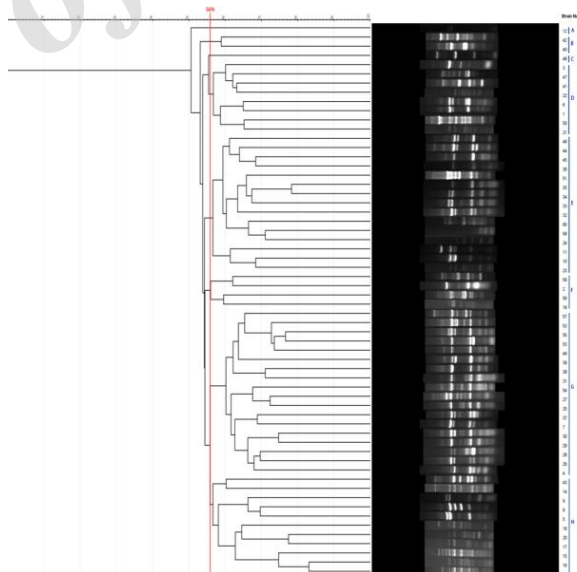
در گیرنده یا محل اثر آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد می‌شود (۹). در تحقیقی که واعظ و همکارانش بر روی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از نمونه‌های مختلف بالینی در اصفهان انجام دادند، سودوموناس آئروژینوزا نسبت به سیپروفلوکساسین ۵۳/۷ درصد مقاومت نشان داد (۳۰). در تحقیق فاضلی و همکاران بر روی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده از زخم‌های سوختگی، ۹۸/۷ درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین گزارش شد (۱۲). در صورتی‌که خلجی و همکاران میزان حساسیت به سیپروفلوکساسین در سودوموناس را ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۲۰). مقایسه نتایج این تحقیق (۹۹ درصد حساسیت) با تحقیق‌های دیگر نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها کم‌تر بوده و هنوز کارایی لازم را جهت درمان بیماران مبتلا به این باکتری دارا می‌باشد. عربستانی و همکاران نشان دادند که ۹/۶٪ سویه‌ها نسبت به ایمپنم مقاومند که با نتایج حاصل از این مطالعه تفاوت دارد (۲)، در صورتی‌که میهنی و همکاران طی پژوهشی که بر روی نمونه‌های جداسازی شده بیمارستان سوانح و سوختگی طالقانی اهواز انجام دادند نشان دادند که ۴۱٪ سویه‌ها به ایمپنم مقاوم بودند (۲۴). فاضلی و همکاران در سال ۱۳۸۸ مقاومت ۹۴/۴ درصدی نسبت به ایمپنم را در سویه‌های سودوموناس جدا شده از بیماران سوختگی گزارش کردند که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر اختلاف زیادی دارد (۱۲). مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران دچار سوختگی بیش از سایر موارد است در صورتی‌که در مطالعه حاضر نمونه‌های جداسازی شده از موارد سوختگی به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیمین و سولفومتوکسازول - تریمتوپریم مشاهده شد که این یک مقاومت ذاتی است که نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در سودوموناس وجود دارد. عفونت پس از سوختگی به علت آلوده شدن زخم سوختگی با سودوموناس آئروژینوزا موجود در محیط بیمارستان است. تفاوت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان‌های مختلف مؤید این مطلب است که در مکان‌هایی که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی وجود دارد به راحتی از طریق ژنتیکی قابل انتقال است.

در مطالعه آذرگون و همکاران از ۵۱ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، ۳۷/۲٪ مقاوم به جنتامایسین، ۲۱/۵٪ مقاوم به آمیکاسین، ۱۵/۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین و ۹/۸٪ مقاوم به سفنازیدیم بودند (۳). در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده از مراکز درمانی شهر اراک

گروه‌های A-H نامیده می‌شوند. گروه G غالب بوده و ۳۰٪ از کل نمونه‌ها را شامل می‌شود. گروه E بعد از گروه G دارای بیش‌ترین تعداد نمونه بوده و ۲۵٪ کل نمونه‌ها را شامل شده است. گروه H نیز ۱۸/۳۳ درصد نمونه‌ها و گروه D، ۱۳/۳۳ نمونه‌ها و گروه F، ۶/۱۶۶ نمونه‌ها، گروه B، ۳/۳۳ نمونه‌ها، گروه A و C، ۱/۱۶۶ نمونه‌ها را شامل شده اند.



شکل ۲: الگوی بانندی حاصل از ERIC PCR سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از پرایمرهای ERIC بر روی ژل آگارز، به ترتیب از سمت چپ: M: مارکر ۱۰۰ bp، ۲- کنترل مثبت، ۳- کنترل منفی، ۱۴- محصول ERIC PCR سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا



شکل ۳: دندوگرام رابطه ژنتیکی ایزوله سودوموناس آئروژینوزا. نتایج به دست آمده از ERIC PCR با استفاده از دو پرایمر

بحث

استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی سبب بروز سویه‌های مقاوم شده است (۲۲). این مقاومت به وسیله القاء آنزیم‌های غیر فعال کننده آنتی‌بیوتیک‌ها یا موتاسیون در ژن‌های کد کننده پروتئین‌های غشای خارجی، تغییر

در مطالعه حاضر نیز در فراوانی ژن های *plcH* و *lasB* و *plcN* در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت سوختگی تفاوت وجود ندارد. هم چنین در مطالعه های متعددی مشاهده شده این سه ژن در سودوموناس های جدا شده از زخم، سوختگی و دستگاه تنفسی دارای فراوانی بالا می باشند (۲۷،۲۵،۸).
Zhu و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت *lasI*، *lasR* و *rhIR* را در نمونه های سودوموناس مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که این ژن ها ممکن است با حضور در ایزوله های بالینی موجب ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی گردد. در صورتی که در مطالعه ما حضور ژن *lasB* نشان می داد که این ژن در ایجاد مقاومت نقشی نداشته و بیش تر در بیماری زایی مؤثر می باشد (۳۲).

نتیجه گیری

استفاده از PCR جهت جداسازی و شناسایی سودوموناس آئروژینوزایی که عفونت پوستی حاصل از سوختگی را ایجاد می کند مناسب می باشد و امکان دارد این ژن ها در سایر نمونه های بالینی شیوع کمتری داشته باشند. با مقایسه نتایج سایر تحقیق ها با نتایج به دست آمده از بررسی حاضر به نظر می رسد که روش ERIC کارایی مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در سویه های سودوموناس آئروژینوزا دارد. از آنجایی که اپیدمی های عفونت به طور معمول توسط یک کلون خاص و عفونت های تک گیر به طور معمول توسط کلون های مختلف ایجاد می شوند، به همین دلیل باید همه ایزوله ها توسط روش های تایپینگ مناسب انگشت نگاری شوند تا سویه های مربوط شناسایی و تعیین هویت شوند.

میزان مقاومت سفنازیدیم (۳۳٪/۳)، آمیکاسین (۲۰٪/۳)، سیپروفلوکساسین (۱۵٪/۷) جنتامایسین (۱۹٪/۴) به دست آمد (۲۸)، در صورتی که در مطالعه حاضر کمترین میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، ای می پنم و آرتروئوزا مشاهده گردید و این تفاوت به نظر می رسد می تواند به دو دلیل باشد: ۱ - ناشی از تفاوت در منبع سویه ها، ۲ - به دلیل ایجاد مقاومت در سال های اخیر نسبت به این آنتی بیوتیک باشد. بسیاری از فاکتورهای بیماری زای باکتری سودوموناس آئروژینوزا به وسیله یک سیستم ژنتیکی به نام سیستم کروم سنسینگ (QS) کنترل و تنظیم می گردند (۱۹).

در این تحقیق مشخص گردید میزان فراوانی ژن *lasB* در نمونه های بالینی بیش تر بوده و اختلاف در فراوانی سویه ها می تواند تحت تأثیر عوامل محیطی باشد. مقایسه نتایج سایر تحقیق ها با نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که استفاده از پرایمرهایی با ویژگی های بالا و حساسیت، می تواند در تشخیص به موقع و سریع ژن های بیماری زا در بیماران به کار گرفته شود. با توجه به نوع نمونه های جمع آوری شده، نقش این ژن در عوارض ناشی از سوختگی با توجه به نوع آزمون های ترشحاتی به طور کامل هم خوانی داشته و مؤید این مطلب است که نوع نمونه نیز می تواند در اعلام میزان شیوع ژن ها مرتبط باشد.

Lanotte و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در تحقیقی تحت عنوان بررسی ویژگی های ژنتیکی گونه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با سایر نمونه های جداسازی شده سودوموناس، به این نتیجه رسیدند که فراوانی ژن های *plcH* و *lasB* و *plcN* در نمونه ها ۱۰۰ درصد بوده است (۲۱). در حالی که Wolska سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی مختلف را با روش ERIC PCR گروه بندی کرد و مشاهده کرد ۴۹ درصد سودوموناس ها در سه گروه قرار دارند و ما بقی باکتری ها الگوی منحصر بفردی داشتند، میزان فراوانی ژن های *plcH* و *lasB* در دسته اول ۱۰۰ درصد و ژن *plcN* حدود ۹۱ درصد بود و در سودوموناس هایی که الگوی منحصر بفردی را نشان دادند میزان فراوانی *lasB* حدود ۸۴٪/۶ و *plcH* و *plcN* حدود ۷۶٪/۹ بود (۳۱).

مطالعه های محققان مختلف نشان داد ژن *plcN* عامل فعالیت های پیش التهابی (۲۳)، فاکتور بیماری زایی (۱۷)، التهاب ریوی (۲۳) و ممانعت از انفجار اسیداتیو در نوتروفیل (۲۹) است. در حالی که Fazeli نشان داد توزیع ژن های *plcN* و *lasB* و *plcH* در نمونه های بالینی مختلف مانند عفونت تنفسی، ادرار، زخم بستر، سوختگی و زخم تفاوت مشخصی وجود ندارد (۱۴).

منابع

1. Akya A, Salimi A, Nomanpour B, Ahmadi K. Prevalence and Clonal Dissemination of Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Kermanshah. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(7).
2. Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi MR, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of efflux pump mexab-oprm and oprd of pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples using PCR. *Arch Iranian Med.* 2015;18: 102-08.
3. Azargoon R, Doustdar F, Khanbabaee G, Ghazi M, Mehrnejad F, Goudarzi H. Type III secretion system characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with cystic fibrosis. *Research in Medicine.* 2013; 37 (3) :1890-193 [Persian]
4. Bielecki P, Glik J, Kawecki M, dos Santos VAM. Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol lett.* 2008;30(5):777-90.
5. Champagne CP, Laing RR, Roy D, Mafu AA, Griffiths MW, White C. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1994;34(1):1-30.
6. Cheng X, Wang P, Wang Y, Zhang H, Tao C, Yang W, et al. Identification and distribution of the clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-βlactamase and/or class 1 integron genes. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2008;28:235-8.
7. Clinical and laboratory standard institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100-S17. Wayne: CLSI;2007 .
8. Cotar AI, Chifiriuc MC, Banu O, Lazar V. Molecular characterization of virulence patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from respiratory and wound samples. *Biointerface Res Appl Chem* 2013; 3: 551-558.
9. Lambert P. Mechanisms of antibiotic resistance in *pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 2002;95: 22.
10. Cockerill FR, Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: approved standard. National Committee for *Clinical Laboratory Standards*; 2012.
11. Daly M, Power E, Björkroth J, Sheehan P, O'Connell A, Colgan M, et al. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(6):2723-9.
12. Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). *Iran J Med Microbiol.* 2010; 3 (4) :1-8.
13. 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 Sci.* 2012;29(171):1-12 .[Persian]
14. Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iranian Hospital Infections. *Iran Red Crescent Med J.* 2014 October; 16(10): e15722
15. Ferguson MW, Maxwell JA, Vincent TS, da Silva J, Olson JC. Comparison of the exoS gene and protein expression in soil and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2001;69(4):2198-210.
16. Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol.* 2011;2.
17. Idris SN, Desa MN, Aziz MN, Taib NM. Antimicrobial susceptibility pattern and distribution of exoU and exoS in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* at a Malaysian hospital. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012;43(1):116–23.
18. Imani Foolad A, Hosainzadeh M, Mousavi SF. Association between exotoxin a (exo-a) gene and antibiotic resistance pattern with biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ardabil Uni Med Sci.* 2011;11(1):7-13 .[Persian]
19. Jiang Q, Yang Y, Xin K, Bian X, Li M, Zhang B, et al. Microbial diversity analysis of subclinical mastitis in dairy cattle in Northeast China. *Afr J Microbiol Res.* 2015;9(10):687-94.

20. Khalaji Y, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Molecular evaluation of antibiotic resistance prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches in Southwest Iran. 2013;5(9):420-4.
21. 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 other origins. *J Med Microbiol*. 2004;53(1):73-81.
22. Makedou K, Tsiakiri E, Bisiklis A, Chatzidimitriou M, Halvantzis A, Ntoutsou K, et al. Changes in antibiotic resistance of the most common Gram-negative bacteria isolated in intensive care units. *J Hosp Infect*. 2005;60(3):245-8.
23. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 2001;183(21):6454-65.
24. Mihani F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM genes by PCR. *Iran J Med Microbiol*. 2007;1: 23-31.
25. Nikbin VS, Aslani MM, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour GH. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. *Iranian J Microbiol* 2012; 4: 118-123.
26. Putman . M .van, Veen .H .W ,2000 , molecular properties of bacterial multidrug transporters.
27. Sabharwal N, Dhall Sh, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2014;5(3):125-134.
28. Taghvaei R, Shojapour M, Sadeghi A, Pourbabay AA. The Study of Antibiotic Resistance Pattern and the Frequency of Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBL) in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Medical Centers in Arak City, Iran. *Qom Univ Med Sci J*. 2013; 7(4): 36-41.
29. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AI, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun*. 1999;67(5):2371-6.
30. Vaez H, Faghri J, Esfahani BN, Moghim S, Fazeli H, Sedighi M, et al. Antibiotic Resistance Patterns and Genetic Diversity in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Patients of a Referral Hospital, Isfahan, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(8).
31. Wolska K, Szweda p. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *polish j Mic*. 2009.58(3). 255-260.
32. Zhu H, Bandara R, Conibear TCR, Thuruthiyil SJ, Rice SA, Kjelleberg S, Givskov M and Willcox MDP. *Pseudomonas aeruginosa* with LasI Quorum-Sensing Deficiency during Corneal Infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1897-1903.