

ردیابی ژن‌های اگزوتوکسین S، U، T، Y، A در سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم جداشده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر قم

سید سهیل آقائی^{۱*}، علی جوادی^۱، یاسر شریفی^۲، عباس مروتی^۱

چکیده

زمینه و هدف: یکی از شایع‌ترین مشکلات در بیمارستان‌ها، عفونت‌های ایجادشده توسط باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد که برای انسانها یک پاتوژن فرصت‌طلب محسوب می‌شود. ۵ آنزیم مهم شامل: اگزوتوکسین S، U، T، Y، A فاکتورهای مهم بیماری‌زایی این باکتری هستند. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی این آنزیم‌ها در نمونه‌های جداشده از بیمارستان‌های شهر قم و تعیین الگوی آنتی‌بیوگرام آنها نسبت به نسل سوم سفالوسپورین‌ها با استفاده از استانداردهای CLSI انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه به روش مقطعی - تحلیلی، ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جداشده از نمونه‌های بالینی مختلف از بیمارستان‌های شهر قم بررسی شد. ابتدا با تست‌های بیوشیمیایی، باکتری‌شناسایی و سپس طبق استانداردهای CLSI الگوی آنتی‌بیوگرام آنها نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم به دست آمد. پس از استخراج ژنوم (کیت استخراج شرکت سینا کلون)، طراحی و ارزیابی پرایمرها در سایت NCBI و واکنش PCR برای بررسی هر یک از ژن‌ها انجام شد. پس از الکتروفورز، نتایج باندهای حاصل از واکنش PCR در دستگاه نمایانگر ژل مشاهده گردید.

یافته‌ها: میزان فراوانی جدایه‌ها در نمونه‌های پوست، خون، ریه و ادرار به ترتیب برابر ۶۳/۲، ۱۶/۱، ۱۶/۱ و ۴/۱٪ بود. فراوانی اگزوتوکسین‌های A، T، U، S و اگزوتوکسین Y به ترتیب ۱۰۰، ۳۷/۹، ۲۶/۴، ۳۹/۱ و ۲۹/۹٪ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، مقاومت به داروها و وجود فاکتورهای ویرولانسی نظیر اگزوتوکسین‌ها می‌تواند یک هشدار جدی به مراکز درمانی از نظر کنترل بیماری با این باکتری باشد.

کلید واژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا؛ اگزوتوکسین‌ها؛ مقاومت دارویی؛ بیمارستان، قم، ایران.

گروه میکروبی‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

آبشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

سید سهیل آقائی، گروه میکروبی‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: soheilaghae@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۳۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Aghaei SS, Javadi A, Sharifi Y, Morovvati A. Detection of exotoxin A, Y, T, U, S genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to third-generation cephalosporins in clinical samples of hospitalized patients in hospitals of Qom City, Iran. *Qom Univ Med Sci J* 2016;10(1):48-55.

مقدمه

باکتری سودوموناس آئروژینوزا، باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیرتخمیری متحرک با تک‌تازه قطبی با نیازهای غذایی حداقل است. تمایل برای رشد در محیط‌های مرطوب، به موفقیت اکولوژی و اهمیت آن به‌عنوان یک بیماری‌زای مهم در عفونت‌های کسب‌شده بیمارستانی کمک می‌کند (۱). این باکتری یک پاتوژن فرصت‌طلب بوده که مقاومت فراوانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها کسب کرده است که همین امر باعث مشارکت فراوان آن در عفونت‌های بیمارستانی می‌شود، ضمن اینکه این ارگانیسم با ورود به خون می‌تواند باعث یکی از کشنده‌ترین سپتی‌سمی‌ها بین باکتری‌های گرم منفی شود (۲،۳). توانایی کلونیزه‌شدن این باکتری در مکان‌های مختلف، به‌خصوص در محیط بیمارستان بر اهمیت این باکتری در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی افزوده است (۴). توانایی این باکتری در تولید فاکتورهای بیماری‌زایی فراوان همچون آلزینات، پروتئازها، پیوسیائین، پیوریدین، رامنولپید، فسفولیپاز C، پیلی جهت اتصال و کلونیزاسیون به سلول‌های میزبان و تشکیل بیوفیلم باعث شده که در زمره مهم‌ترین پاتوژن‌ها قرار گیرد (۵). یکی دیگر از فاکتورهای مهم این باکتری، سیستم ترش‌حی نوع سوم است که عامل تزریق مستقیم یک‌سری از پروتئین‌ها به درون سیتوزول سلول هدف می‌باشد (۶). پنج آنزیم مهم شامل آگزوآنزیم T، U، S، Y و A به‌وسیله این سیستم به سلول هدف منتقل می‌شوند. آگزوآنزیم T و S، اولین آنزیم‌های شناخته‌شده در این گروه هستند. آگزوآنزیم S نیز یک نوع سیتوتوکسین است که در کلونیزه‌شدن باکتری نقش ایفا می‌کند. آگزوآنزیم T در هنگام انتشار و فرار پاتوژن تولید می‌شود. در ضمن هر دوی این آگزوآنزیم‌ها فعالیت ADP-ribosyltransferase دارند که از نظر پاتولوژی مشابه توکسین کلرا عمل می‌کنند (۷). تولید آگزوآنزیم Y نیز اثر نسبتاً کمی روی پنومونی موش و اثر معنی‌داری روی سایتوتوکستی سلول‌های MDCK دارد. اثر کشندگی آگزوآنزیم U روی سلول‌های MDCK حدود ۱۰۰ برابر آگزوآنزیم T تخمین زده شده است. همچنین حذف آگزوآنزیم U باعث کاهش اثر پاتوژن در ریه می‌شود. در ضمن، این فاکتور نقش مهمی در شوک سپتیک، شدت و کشندگی در پنومونی از خود نشان داده

است (۷،۸). به‌طور خلاصه آگزوآنزیم‌های S و T، فعالیت ADP-ribose transferase ترانس‌فرازی دارند و باعث کاهش فعالیت ماکروفاژها و فاگوسیتوزها می‌شوند. آگزوآنزیم Y باعث افزایش فعالیت آدنیلات سیکلاز شده و روی مورفولوژی سلولی اثر دارد، آگزوآنزیم U نیز یک سیتوتوکسین مؤثر روی سلول‌های اپی‌تلیال و عامل آسیب‌های ریوی بوده و اثر سمی روی ماکروفاژها دارد، اما مکانیسم عمل آن مشخص نشده است (۹). آگزوتوکسین مهم دیگر این باکتری، آگزوتوکسین A می‌باشد. این توکسین برای سلول‌های یوکاریوتیک سمی بوده و می‌تواند پروتئین‌سازی را درون سلول مهار و باعث صدمات به بافت ریه و مغز شود. این توکسین نیز دارای فعالیت ADP-ribose transferase ترانس‌فرازی بوده و موجب القای تولید اینترلوکین-۱ می‌شود (۱۰). پتانسیل قوی سودوموناس آئروژینوزا برای حمل ژن‌های الحاقی غیرکروموزومی (روی پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها) می‌تواند دلیل خوبی برای وجود و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌خصوص هنگام مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باشد و حضور مقاومت به همراه فاکتورهای بیماری‌زایی نیز می‌تواند این باکتری را به‌عنوان یک پاتوژن بالقوه معرفی کند.

بتالاکتامازها در سودوموناس آئروژینوزا شامل ampC، Extended ESBLs (Spectrum Beta-lactamase) می‌باشند (۱۱). ampC کروموزومی است که بیان بیش از اندازه آن باعث پیدایش مقاومت به سفالوسپورین‌هایی همچون سفتازیدیم می‌شود (۱۲). چندین بتالاکتاماز مربوط به گروه ۱ در سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده است که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به PER-1، TEM-42 و SHV-2a اشاره کرد. این آنزیم‌ها عامل مقاومت به یوریدوپنی‌سیلین، سفتازیدیم، سفپروم و سفپیم می‌باشند (۱۳). با توجه به مطالب بالا، مطالعه حاضر با هدف ردیابی ژن‌های آگزوتوکسین S، U، T، Y، A در سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم جداشده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر قم انجام شد.

روش بررسی

ابتدا ایزوله‌ها از بیمارستان‌های مختلف شهر قم جداسازی شدند.

به دست آید. برای انجام این کار، سوآب پنبه‌ای استریل به سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، آغشته و سپس سوآب مرطوب روی سطح پلیت ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط مولر هیتون آگار، ۳ بار با زاویه ۳۰ درجه به صورت خطوط رفت و برگشت نزدیک به هم کشت داده شد تا بدین ترتیب کل سطح محیط مولر هیتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شود. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت، عمل دیسک‌گذاری انجام شد و از دیسک‌های سفالوسپورینی نسل سوم (ساخت شرکت MAST) استفاده گردید. دیسک‌ها با پنس استریل به فاصله ۲۵ میلی‌متر از هم و ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت حاوی محیط مولر هیتون آگار تلقیح شده، گذاشته شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. نتایج با ثبت قطر هاله عدم رشد و مقایسه با استانداردهای CLSI به دست آمد. باکتری جدا شده ابتدا در محیط کشت Brain Heart Infusion Broth (Merk) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. ژنوم باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج (شرکت سیناکلون) استخراج گردید. در روند طراحی پرایمر، در ابتدا مقالات مربوطه مورد بررسی قرار گرفت و پس از مطالعه ویژگی‌های ژن‌های مختلف، از میان آنها ۵ ژن مهم مربوط به اگزوتوکسین‌های T، U، S، Y و اگزوتوکسین A انتخاب شدند که ساخت آن توسط شرکت سیناکلون صورت گرفته است. سکانس این ژن‌ها برای تشخیص اگزوتوکسین A، ۶۶۴ باز و برای اگزوتوکسین‌های T، S، U و Y به ترتیب ۴۷۱-۳۱۸-۸۸۴-۱۰۱۸ جفت باز طراحی گردید.

جهت بررسی اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده، این پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Primer BLAST در سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center For Biotechnology Information) NCBI، مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول).

از میان ۱۲۰ نمونه بالینی مورد بررسی، ۴۰ ایزوله از بیمارستان نکوئی، ۲۵ ایزوله از بیمارستان شهید بهشتی، ۲۲ ایزوله از بیمارستان کامکار جداسازی شد. این ایزوله‌ها از نمونه‌های ادرار، خون، سوختگی و سایر ایزوله‌ها نیز از نمونه‌های ریه جمع‌آوری شدند. جهت شناسایی، در ابتدا نمونه‌های گرم منفی در محیط TSB تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. سپس به صورت کشت خطی بر روی محیط‌های ستریمید آگار کشت داده شده و ۲۴ ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. سپس باکتری‌ها به محیط TSI منتقل و ایزوله‌هایی که واکنش آنها به صورت قلیایی (عدم تخمیر قندها) بدون تولید گاز و H₂S بود در محیط ستریمید آگار به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. سپس تک‌کلنی‌های رشد یافته، به محیط OF حاوی قند گلوکز انتقال یافتند. ایزوله‌هایی که در محیط OF باز (هوازی) رشد کرده و محیط را اسیدی (زرد) کرده بودند، اما در محیط OF بسته یا بی‌هوازی (با پارافین مایع استریل روی محیط پوشانده شده بود تا شرایط بی‌هوازی شود) رشد نکردند، به عنوان اکسیدکننده گلوکز (غیرتخمیری) یا هوازی شناسایی شدند. تمامی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده در محیط‌های TSB، با ۴۰٪ گلیسرول و نوترینت آگار نیم ظرفیت، به ترتیب در ۷۰- درجه سانتیگراد و در دمای آزمایشگاه جهت انجام آزمایشها ذخیره شدند (۱۴). برای آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن، تعداد ۱ یا ۲ کلنی از کشت خالص ۲۴ ساعته به لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل و به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس ۲۰-۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر محلول سالین منتقل گردید تا کدورتی مشابه کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند

جدول: سکانس پرایمرهای طراحی شده مورد استفاده در این مطالعه

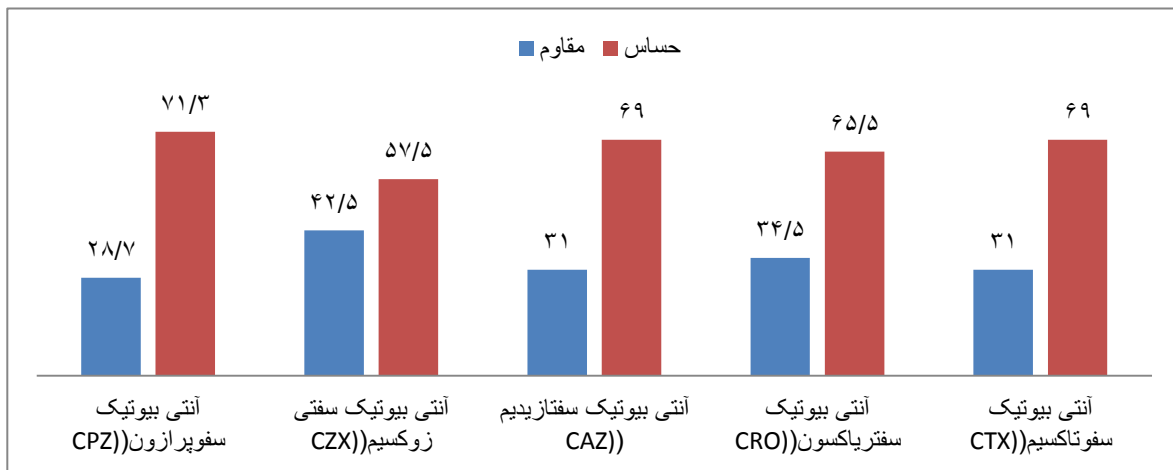
نام پرایمر	توالی پرایمر	نقطه ذوب	اندازه قطعه
Exo AF	CAGGTGATCCGCAACGCC	60.8	664bp
Exo AR	TCAGCCGTTTCGACCTCGCC	60.7	
Exo TF	GCCTGCTCTCCCGCTGG	60.2	471bp
Exo TR	TTTCGCGCAGTTGCTCCGG	61	
Exo SF	GGATGCGGAAAAGTACCTGGGC	60.5	318bp
Exo SR	CTCCTCGCGACACCGGGG	60.9	
Exo UF	GTCGTCGGGGTGCCTGCC	60.8	848bp
Exo UR	GCCTTAGCCATCTCAACGGTAGTCG	61	
Exo YF	CGGATATGCAGGCACGGGC	60.6	1018bp
Exo YR	AGCGGCACGTTCCAGTCGG	60.7	

سیس از هر نمونه، ۷ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر از بافر 6X Loading dye Buffer (sinaclon) مخلوط و در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شد. پرایمرهای این واکنش طوری طراحی گردید تا امکان انجام واکنش به صورت همزمان امکان‌پذیر باشد.

یافته‌ها

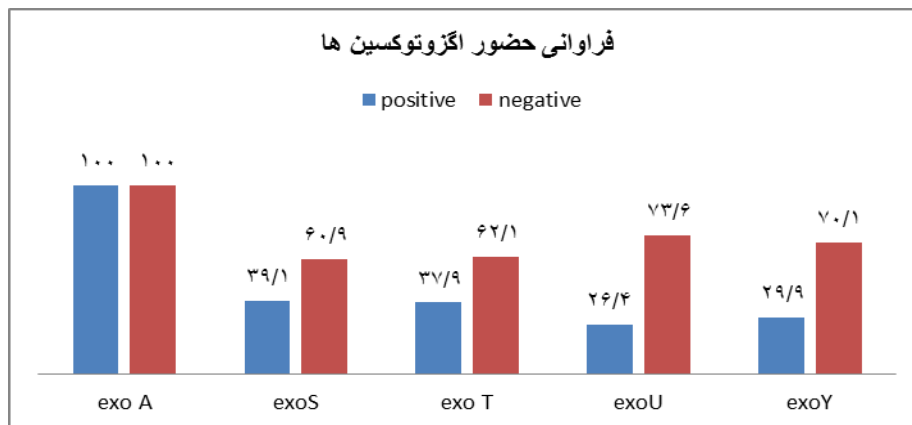
در زنان، ۳۶/۸٪ و در مردان، ۶۳/۲٪ آلودگی مشاهده گردید. میزان این باکتری در نمونه‌های پوست، خون، ریه و ادرار به ترتیب برابر ۶۳/۲، ۱۶/۱، ۱۶/۱ و ۴/۱٪ گزارش شد. بیشترین مقاومت به سفتری‌زوکسیم و بیشترین حساسیت به سفوپرازون در بین ایزوله‌ها وجود داشت (نمودار شماره ۱).

واکنش PCR برای بررسی هر یک از ژن‌ها با شرایط برقراری واکنش در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این حجم، واکنش ۱/۵ میکرومولار از یون منیزیم، ۰/۲ میکرومولار از dNTPs، ۱۰۰ نانوگرم از DNA باکتری استخراج‌شده، از پرایمرهای Forward و Reverse، غلظت ۰/۵ میکرومولار و از آنزیم‌های Taq DNA Polymerase، ۱ واحد آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر با استفاده از برنامه مشخص برای ۳۰ سیکل در دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، سپس دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. بعد از این ۳۰ سیکل، تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در هر واکنش در کنار نمونه‌ها از کنترل منفی استفاده شد.



نمودار شماره ۱: الگوی حساسیت و مقاومت ایزوله‌ها به سفالوسپورین‌های نسل سوم

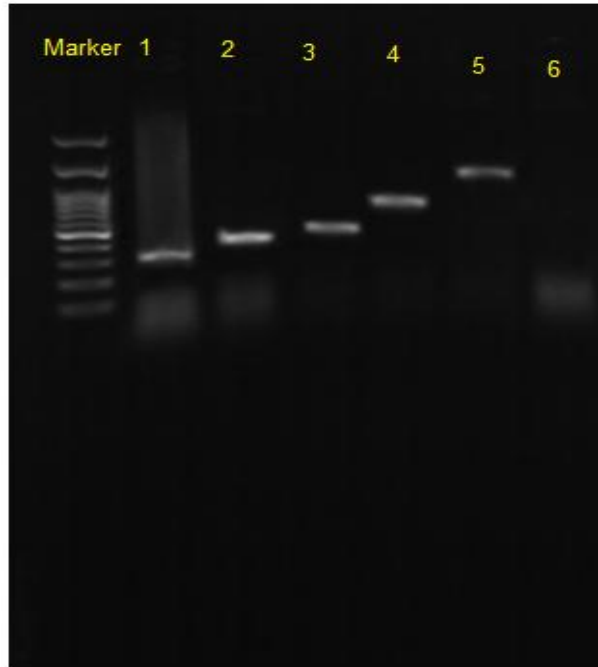
در نتایج PCR برای بررسی حضور ژن آگزوتوکسین‌ها، حضور ژن‌های آگزوتوکسین‌های S، U، T، Y در بین ایزوله‌ها به ترتیب ۲۹/۹، ۲۶/۴، ۳۷/۹، ۳۹/۱٪ به دست آمد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: فراوانی حضور آگزوتوکسین‌ها در نمونه‌های بالینی.

است. از سویی، نتیجه الکتروفورز محصول PCR تیوب کنترل منفی، هیچ‌گونه تکثیری را نشان نداد که تأییدکننده صحت واکنش PCR فوق بود.

در شکل، نتایج الکتروفورز محصول واکنش‌های PCR برای تمامی ژن‌های اگزوتوکسین S با اندازه ۳۱۸bp، اگزوتوکسین T با اندازه ۴۷۱bp، اگزوتوکسین A با اندازه ۶۶۴bp، اگزوتوکسین U با اندازه ۸۴۸bp و اگزوتوکسین Y با اندازه ۱۰۱۸bp، باندهای قابل انتظار را نشان داده



شکل: الکتروفورز ژن‌های مورد مطالعه: 100bp Marker، شماره ۱- محصول PCR مربوط به ژن اگزوتوکسین S با اندازه ۳۱۸ باز؛ ۲- محصول PCR مربوط به ژن اگزوتوکسین T با اندازه ۴۷۱ باز؛ ۳- محصول PCR مربوط به ژن اگزوتوکسین A با اندازه ۶۶۴ باز؛ ۴- محصول PCR مربوط به ژن اگزوتوکسین U با اندازه ۸۴۸ باز؛ ۵- محصول PCR مربوط به ژن اگزوتوکسین Y با اندازه ۱۰۱۸ باز؛ ۶- کنترل منفی

بحث

سودوموناس آئروژینوزا از مهم‌ترین باکتری‌های فرصت‌طلب بیماری‌زا در بیمارستان‌ها محسوب می‌شود. لذا جداسازی و شناسایی این باکتری از نمونه‌های بالینی و گزارش نتایج به مراجع بهداشتی، حایز اهمیت است. از طرفی، حضور فاکتورهای ویروالانس متعدد از جمله اگزوتوکسین‌های مختلف در این باکتری که از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زا در این باکتری می‌باشد، باعث شده این باکتری یک تهدید جدی برای بیماران تلقی گردد. سیستم ترشعی تیپ ۳ در سودوموناس آئروژینوزا، عامل تزریق مستقیم ۴ اگزوتوکسین S، T، U، Y به درون سیتوپلاسم سلول میزبان است (۱۵). تاکنون در کشور، مطالعه جامعی در زمینه شناسایی تمامی اگزوتوکسین‌ها در انواع ایزوله‌های این باکتری صورت نگرفته است، با این حال در مورد برخی از این توکسین‌ها چندین مطالعه در ایران و سایر کشورها به قرار زیر انجام شده است.

در این مطالعه طی بررسی تعداد ۱۲۰ ایزوله بالینی، فراوانی هریک از اگزوتوکسین‌های S، T، U، Y و A متفاوت بود. بر این اساس در بین ۱۲۰ ایزوله مورد بررسی، تعداد ۳۹ ایزوله (۳۹/۱٪) از نظر تولید exoS مثبت بودند. این درحالی است که تنها ۲۶ ایزوله (۲۶/۴٪)، تولیدکننده exoU می‌باشند. همچنین تعداد ۳۷ ایزوله (۳۷/۹٪) از نظر تولید exoT و ۲۹ ایزوله (۲۹/۹٪) از نظر تولید exoY مثبت بود و تمامی ایزوله‌ها از نظر اگزوتوکسین A مثبت گزارش شدند. Khan و همکاران (سال ۱۹۹۴)، با بررسی ژن اگزوتوکسین A در نمونه‌های بالینی و محیطی سودوموناس آئروژینوزا عنوان کردند این کار می‌تواند جهت مطالعات اپیدمیولوژیک مفید باشد و از ردیابی این ژن در نمونه با روش PCR جهت شناسایی سودوموناس استفاده کردند (۱۶). در مطالعه کمالی و همکاران (سال ۲۰۱۰) باکتری سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بخش سوختگی جداسازی و سپس حضور ژن اگزوتوکسین A در آنها مورد تأیید قرار گرفت و آنها این ژن

همچنین Anjum و همکاران (سال ۲۰۱۰)، الگوی حساسیت ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا را به انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی کردند که از بین ۱۰۰ ایزوله، ۶۰٪ ایزوله‌ها به سفوپرازون، ۶۲٪ به سفنازیدیم و ۱۴٪ به سفوتاکسیم حساس بودند (۲۲).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد فراوانی سویه‌های این باکتری در ایزوله‌های پوست از سایر ایزوله‌ها بیشتر است. با توجه به آنالیزهای آماری انجام‌شده، ارتباط معنی‌داری میان بیمارستان‌ها و نوع نمونه با تولید اگزوتوکسیم‌های مختلف وجود دارد. این مطلب نشان می‌دهد اگزوتوکسیم‌های مختلف در این باکتری که جزء مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی در سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد یک تهدید جدی برای بیماران تلقی می‌شود. با توجه به اینکه سودوموناس آئروژینوزا از مهم‌ترین باکتری‌های فرصت‌طلب بیماری‌زا در بیمارستان‌ها می‌باشد، لذا جداسازی و شناسایی آن از نمونه‌های بالینی و محیطی حایز اهمیت است. همچنین این مسئله اهمیت غربالگری مقاومت آنتی‌بیوتیکی به صورت دوره‌ای را در بیمارستان‌های مذکور نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی (به شماره ۳۸۹۲ مورخ ۱۳۹۲/۲/۱۸) بوده که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی، استان قم به انجام رسیده است. بدین وسیله از مسئولین دانشگاه که شرایط اجرای فعالیت‌های پژوهشی را فراهم آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

- Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and practice of clinical bacteriology. 2nd ed. New York: Wiley Press; 2006. p. 427-31.
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principle and practice of infectious disease. 6th ed. New York: Churchill Livingstone Press; 2005. p. 216,1023-8.
- Goldman E, Green L. Practical handbook of microbiology. 2nd ed. CRC Press; 2009. p. 216-30.

را استخراج و روی وکتور مناسب کلون کردند تا پروتئین نوترکیب را از آن تهیه کنند (۱۷). Wolska و همکاران (سال ۲۰۰۹)، ویژگی‌های ژنتیکی ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا را از نظر حضور ۶ ژن ویروانس مطالعه کردند. در این پژوهش، تنها ژن exoS و exoA بررسی شد که از بین ۴۹ جدایه، ۴۶/۱۵٪ دارای ژن exoS و ۷۶/۹٪ دارای ژن exoA بودند (۱۸).

در مطالعه Pollack و همکاران (سال ۱۹۷۷)، از نمونه پوست بیماران، ۷۵ ایزوله سودوموناس جدا شد و آنها از نظر تولید اگزوتوکسین در شرایط invitro مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۸۷٪ آنها توانایی تولید اگزوتوکسین را داشتند (۱۹). Berthelot و همکاران (سال ۲۰۰۳) نیز ابتدا ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا را از بیماری باکتری می‌جدا و سپس ژن‌های exoU و exoS را با استفاده از روش Real-time PCR مورد مطالعه قرار دادند. این دو ژن در بین ۱۶ سروتیپ مورد بررسی قرار گرفت که تنها سروتیپ ۴، هر دو ژن را دارا بود (۲۰).

مطالعه الگوی آنتی‌بیوگرام در نمونه‌های جداشده از زنان نشان می‌دهد میزان مقاومت به سفکسیم، سفوپرازون، سفتریاکسون، سفنازیدیم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم به ترتیب برابر ۳۴/۴، ۳۴/۸، ۳۴/۴، ۴۳/۸ و ۳۷/۵٪ می‌باشد. میزان فراوانی اگزوتوکسین‌ها در نمونه‌های جداشده از زنان برای نوع A برابر ۱۰۰، نوع S برابر ۳۴/۴٪، نوع T برابر ۴۰/۶٪، نوع U برابر ۱۸/۸٪ و برای نوع Y، ۳۱/۳٪ می‌باشد.

در مورد بررسی مقاومت این باکتری به سفالوسپورین‌ها، مطالعات زیادی انجام گرفته است از جمله این مطالعات می‌توان به پژوهش Saeed و همکاران (سال ۲۰۰۹) اشاره کرد. در مطالعه آنها، ۲۹۳ ایزوله از نمونه‌ها کلینیکی و محیط بیمارستان جدا شد که ۹۱٪ آنها به سفوتاکسیم و ۷٪ به سفتریاکسون حساس بودند (۲۱).

4. Topley WWC, Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. Washington D.C: Bacteriology ASM Press; 2005. p. 1591-603.
5. Ramos JL, Filloux A. Pseudomonas: Molecular microbiology and biodiversity, Infection. Washington D.C: Bacteriology ASM Press; 2010. p. 222-31. (Vol 6)
6. Lory S, Strom MS. Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of Pseudomonas aeruginosa-a review. Gene 1997; 192(1):117-21.
7. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000;406(6799):959-64.
8. Mazel D. Integrons: Agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol 2006; 4(8):608-20.
9. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol 1995; 15(4):593-600.
10. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: Mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol 2007;15(7):301-9.
11. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS). System report, data summary from January 1992 to June 2002. Am J Infect Control 2002;30(8):458-75.
12. Wilmoth D, Walters PE, Tomlin R, McCray SF. Caring for adults with cystic Fibrosis. Crit Care Nurse 2001;21(3):34-44.
13. Willcox MD, Holden BA. Contact lens related corneal infections. Biosci Rep 2001;21(4):445-61.
14. Lennette EH, Spaulding JP. Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology; 1974. p. 345-67.
15. Strateva T, Markova B, Ivanova D. Distribution of the type III effector proteins-encoding genes among nosocomial Pseudomonas aeruginosa isolates from Bulgaria. Ann Microbiol 2010;60(3):503-9.
16. 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.
17. Bayat E, Kamali M, Zareei Mohmoodabadi A, Mortazavi Y, Ebrahim Habibi A, Amini B, et al. Isolation, determination and cloning of translocation domain of exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. Trauma 2010;15(3):149-54.
18. Wolska K, Szweda P. Genetic features of clinical Pseudomonas aeruginosa strains. Pol J Microbiol 2009;58(3):255-60.
19. Pollack M, Taylor NS, Callahan L. Exotoxin production by clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 1977;15(3):776-80.
20. Berthelot P, Attree I, Plésiat P, Chabert J, de Bentzmann S, Pozzetto B, Grattard F, et al. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of Pseudomonas aeruginosa bacteremia isolates: Evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. J Infect Dis 2003;188(4):512-18.
21. Saeed HA, Awad AA. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to third generation cephalosporins. J Sci Tech 2009;10(2):195-200.
22. Anjum F, Mir A. Susceptibility pattern of Pseudomonas aeruginosa against various antibiotics. African J Microbiol Res 2010;4(10):1005-12.

Detection of Exotoxin A, Y, T, U, S genes of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Resistant to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Samples of Hospitalized Patients in Hospitals of Qom City, Iran

Seyyed Soheil Aghaei^{1*}, Ali Javadi¹, Yaser Sharifi², Abbas Morovvati¹

¹Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

²Young Researchers & Elite Club, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

*Corresponding Author:
Seyyed Soheil Aghaei,
Department of Microbiology,
Qom Branch, Islamic Azad
University, Qom, Iran.

Email:
soheilaghaee@yahoo.com

Received: 14 Apr, 2015

Accepted: 21 Jun, 2015

Abstract

Background and Objectives: One of the most common problems in hospitals is infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* that is an opportunistic pathogen for humans. Five important enzymes, including exotoxin A, Y, T, U, S are major virulence factors in this bacterium. The purpose of this study was to determine the frequency of these enzymes in the samples isolated from hospitals of Qom city and to determine their antibiogram pattern against third-generation cephalosporins using CLSI standards.

Methods: In this cross-sectional analytical study, 120 strains of *P. aeruginosa* isolated from various clinical specimens from hospitals of Qom city, were examined. At first, bacteria were identified using biochemical tests, and then their antibiogram pattern against third-generation cephalosporins was obtained according to CLSI standards. After genome extraction (extraction kit of Sinaclon Co.), primers design and evaluation were performed through NCBI website, and PCR reaction was conducted to evaluate each gene. After electrophoresis, the bands' results obtained from PCR reaction, was observed in gel doc system.

Results: The frequency of the isolates in the samples of skin, blood, lung, and urine was, respectively, 63.2, 16.1, 16.1%, and 4.1%. The frequency of exotoxins A, T, U, S, and exoenzyme Y were respectively obtained to be 100, 37.9, 26.4, 39.1, and 29.9%.

Conclusion: According to the results of this study, drug resistance and presence of virulence factors, such as exotoxins can be a serious warning to treatment centers in terms of control of disease caused by this bacterium.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Exotoxins; Drug Resistance; Qom, Iran.