

## بررسی مولکولی فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلزینات در ایزوله‌های *Pseudomonas Aeruginosa* جدا شده از نمونه‌های زخم سوختگی

سید حمیدرضا مرتضوی<sup>۱</sup>، مهدی قادری<sup>۲</sup>، میترا همتی<sup>۳</sup>، سیاوش وزیری<sup>۴</sup>، محسن عزیزی<sup>۵</sup>، مهسا کاشف<sup>۶</sup>، کمال احمدی<sup>۶</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** *Pseudomonas aeruginosa* از جمله عوامل عفونت‌های بیمارستانی است که دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی سازگاری محیطی بالایی است. هدف از انجام این مطالعه، تعیین فراوانی ژن‌های Exotoxin A و alg D (ETA) در ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده از زخم سوختگی بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه، تعداد ۱۸۸ نمونه‌ی جدا شده از زخم سوختگی مورد بررسی قرار گرفت. پس از شناسایی ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی، آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به روش انتشار از دیسک (Kirby-Bauer) انجام گرفت. سپس، از پرایمرهای اختصاصی جهت تعیین ژن‌های Exotoxin A و alg D در میان ایزوله‌ها استفاده گردید. داده‌های به دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از ۱۸۸ نمونه‌ی اخذ شده از بیماران، در نهایت ۹۱ نمونه‌ی *Pseudomonas aeruginosa* تشخیص داده شد. فراوانی (درصد) مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفیپم، آمیکاسین، سفنازیدیم، جنتامیسین، پپراسیلین، سیپروفلوکساسین و ایمی‌پنم به ترتیب ۸۰ (۸۷/۹ درصد)، ۷۷ (۸۴/۶ درصد)، ۶۹ (۷۵/۸ درصد)، ۶۷ (۷۳/۶ درصد)، ۶۶ (۷۲/۶ درصد)، ۶۳ (۶۹/۲ درصد)، ۶۲ (۶۸/۲ درصد) و ۵۳ (۵۸/۲ درصد) بود. فراوانی (درصد) نتیجه‌ی مثبت واکنش Polymerase chain reaction (PCR) برای ژن‌های Exotoxin A و alg D به ترتیب ۸۸ (۹۶/۷ درصد) و ۷۹ (۸۷/۰ درصد) به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** فراوانی بالای ژن‌های Exotoxin A و alg D و همچنین مقاومت دارویی بالا، نشان دهنده‌ی افزایش قابلیت بیماری‌زایی این ارگانیسم و درمان مشکل بیماران مبتلا به عفونت زخم سوختگی می‌باشد. از این رو، شناسایی و تشخیص به موقع این پاتوژن‌های مقاوم، می‌تواند در انتخاب راه‌کارهای مناسب جهت پیش‌گیری و درمان مناسب مؤثر باشد.

**واژگان کلیدی:** *Pseudomonas aeruginosa*، ژن Exotoxin A، alg D

**ارجاع:** مرتضوی سید حمیدرضا، قادری مهدی، همتی میترا، وزیری سیاوش، عزیزی محسن، کاشف مهسا، احمدی کمال. بررسی مولکولی فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلزینات در ایزوله‌های *Pseudomonas Aeruginosa* جدا شده از نمونه‌های زخم سوختگی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۴۱۲): ۱۵۴۳-۱۵۳۷

### مقدمه

عفونت‌های خطرناک و تهدیدکننده‌ی حیات را ایجاد کند (۱-۲). این باکتری، از عوامل اصلی مرگ و میر در بیماران مبتلا به سوختگی‌های شدید محسوب می‌شود (۳) و دارای طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زایی شامل انواع اگزوتوکسین‌ها، لیپوپلی‌ساکارید، پیلی، فسفولپلیازها، الاستاز، پروتئازها، آلزینات و ... است (۴). اگزوتوکسین A (ETA یا Exotoxin A)، یک پروتئین ۶۶ کیلو

*Pseudomonas aeruginosa*، یک باکتری گرم منفی و از جمله مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب در منابع بیمارستانی به خصوص در بخش‌های سوختگی و جراحی محسوب می‌شود و می‌تواند در تعداد زیادی از افراد بستری در این مراکز درمانی همچون مبتلایان به سرطان، بیماران نقص ایمنی، سیستیک فیبروزیس و سایر بیماران،

۱- استادیار، گروه اطفال، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران

۳- دانشیار، گروه اطفال، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۴- دانشیار، گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۵- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: کمال احمدی

از آبان ماه سال ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ۱۳۹۵ انجام گرفت. در این مطالعه، از ۱۸۸ بیمار بستری در بخش سوانح سوختگی بیمارستان امام خمینی (ره) شهر کرمانشاه که دچار زخم سوختگی بودند و بیش از یک هفته آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند، در موقع تعویض پانسمان نمونه‌ی زخم سوختگی اخذ گردید. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، در شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال یافتند و بعد از کشت بر روی محیط‌های کشت Blood agar و Nutrient agar (Highmedia, India) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. در ادامه، برای شناسایی و تأیید نهایی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* از سایر میکروارگانیسم‌ها، از محیط کشت و آزمایش‌های اختصاصی باکتری‌شناسی شامل Sulfide Indole Motility, (TSI) Triple sugar iron agar, (SIM) Methyl red, (MR) Voges-Proskauer, (VS), Oxidative-fermentative (OF), اکسیداز، کاتالاز، لی‌زین دکربوکسیلاز، اندول، تولید سیترات و پیگمان استفاده شد. بعد از شناسایی ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* از نمونه‌های مورد بررسی، موارد تشخیص داده شده‌ی این باکتری، پس از تلفیح به محیط نگهدارنده در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۳).

در ادامه، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و با به کارگیری استاندارد ۵/۵ McFarland و مطابق با دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گرفت (۱۴).

در این مطالعه، از سویه‌ی استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 به منظور کنترل کیفی واکنش‌ها استفاده گردید. در ابتدا، باکتری‌های جدا شده بر روی محیط Muller-Hinton (Highmedia, India) کشت داده شدند. برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری، از ۸ دیسک آنتی‌بیوتیکی (Highmedia, India) شامل سفنازیدیم، آمیکاسین، جنتامایسین، پیراسیلین، سفوتاکسیم، سیپروفلوکساسین، سفیمپ و ایمی‌پنم استفاده شد.

در مرحله‌ی بعد، جهت بررسی فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلزینات به کمک پرایمرهای اختصاصی طبق جدول ۱، واکنش Polymerase chain reaction (PCR) انجام شد (۱۵-۱۶). ابتدا کل محتوای ژنومی باکتری با روش Boiling استخراج شد. به این منظور، چندین کلنی خالص باکتری در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و پس از ۵ دقیقه جوشاندن و خنک شدن در مرحله‌ی بعد، در دور ۷۰۰۰ g (یا RCF) به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جهت انجام واکنش PCR به لوله‌های اپندورف جدید منتقل شد و به عنوان DNA باکتری به کار

دالتونی و عامل اصلی بیماری‌زایی *Pseudomonas aeruginosa* است که توسط سیستم ترشچی نوع II در مرحله‌ی سکون رشد و کمبود منابع آهن در دسترس باکتری تولید می‌شود. این توکسین، دارای مکانیسم عمل شبیه توکسین دیفتری است که با ریبوزیله کردن عامل طولیل‌سازی (Eukaryotic elongation factor یا EF2) و مهار پروتئین‌سازی، باعث مرگ سلولی در میزبان می‌شود (۵). این توکسین، در حدود ۹۰ درصد از ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* وجود دارد و ژن آن بر روی کروموزوم باکتری قرار گرفته است (۶). در اغلب بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری، اگزوتوکسین A قابل جداسازی است (۷).

آلزینات، از جمله دیگر عوامل ویرولاکس *Pseudomonas aeruginosa* است که توسط ژن alg D کد می‌شود. در حدود ۱۲ ژن مختلف در ساخت آلزینات دخیل هستند که عملکرد همه‌ی این ژن‌ها، تحت کنترل پروموتور alg D می‌باشد. نقش آلزینات در *Pseudomonas aeruginosa*، شامل جلوگیری از خروج باکتری از ریه و در نتیجه کمک به پایداری باکتری در این بافت، عمل به عنوان ادهسین، تشکیل بیوفیلم و ایجاد ظاهر براق در کلنی‌های این میکروارگانیسم می‌باشد (۸-۹).

مسأله‌ی وجود مقاومت دارویی در *Pseudomonas aeruginosa* یکی از مشکلات اصلی در روند درمان بیماران بستری در مراکز درمانی از جمله افراد دچار سوختگی محسوب می‌شود. این باکتری دارای مقاومت بالایی به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل انواع بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها و سایر داروها است (۱۰). از جمله عوامل اصلی ایجاد مقاومت دارویی در این باکتری، می‌توان به تولید بتالاکتامازها، وجود پمپ‌های ترشچی و ایجاد تغییرات در غشای خارجی آن اشاره کرد (۱۱).

امروزه، به دلیل وجود سطح بالایی از مقاومت‌های ذاتی و اکتسابی در *Pseudomonas aeruginosa* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب و مؤثر برای درمان عفونت‌های حاصل از آن با مشکل روبه‌رو شده است (۱۲). با توجه به این که مطالعه‌ی در زمینه‌ی بررسی فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلزینات *Pseudomonas aeruginosa* در این منطقه انجام نشده بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین فراوانی این ژن‌ها در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده از نمونه‌های زخم سوختگی بیماران در بیمارستان امام خمینی (ره) شهر کرمانشاه در سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ انجام شد.

## روش‌ها

این پژوهش، از نوع توصیفی-مقطعی بود که طی یک دوره‌ی ۶ ماهه

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها و چرخه‌های دمایی مورد استفاده برای شناسایی *Pseudomonas aeruginosa*

پرایمر	توالی (۵'-۳')	اندازه‌ی محصول (bp)	۳۵ چرخه	
			Extension ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد	Annealing ۱ دقیقه
اگزوتوکسین (ETA) A	5'- CAGGTGATCCGCAACGCC -3' 5'- TCAGCCGTTTCGACCTCGCC -3'	۶۶۴	۷ دقیقه	۶۰/۸ درجه‌ی سانتی‌گراد
آلزینات (alg D)	5'-TTCCCTCGCAGAGAAAACAT -3' 5'-CCTGGTTGATCAGGTCGATCT-3'	۵۲۰	۷ دقیقه	۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد

بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها نسبت به سفوتاکسیم (۸۷/۹ درصد) و سفپیم (۸۴/۶ درصد) و همچنین، کمترین مقاومت در برابر ایمی‌پنم ۵۳ (۵۸/۲ درصد) مشاهده شد (جدول ۲). با توجه به نتایج جدول ۳، فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلزینات (alg D) به ترتیب شامل ۸۷/۰۰ درصد و ۹۶/۷ درصد مشخص شد. نتایج الکتروفورز محصول واکنش PCR ژن‌های ETA و alg D در شکل ۱ آمده است.

### بحث

به دلیل توانایی در ایجاد طیف وسیعی از انواع عفونت‌های بیمارستانی توسط *Pseudomonas aeruginosa* جداسازی و شناسایی عوامل ویروالانس این باکتری در مراکز درمانی از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعات مختلف انجام گرفته، میزان شیوع متفاوتی از حضور *Pseudomonas aeruginosa* در نمونه‌های بالینی جدا شده از انسان گزارش شده است. در این پژوهش، این فراوانی به میزان ۴/۴۸ درصد مشاهده شد. برای مثال، این میزان را در مطالعات داخل و خارج از کشور به ترتیب ۴۷/۰۰ درصد، ۴۶/۴۷ درصد، ۳۷/۳ درصد و ۲۹/۶ درصد عنوان کرده‌اند (۲۰-۱۷). یافته‌های این مطالعات، با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد.

رفت. برای واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، از ۵/۱۲ میکرولیتر Master Mix (شرکت سیناکلون ایران)، ۳ میکرولیتر DNA باکتری، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. مراحل دمایی واکنش PCR شامل Denaturation اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه طبق جدول ۱ و در پایان ۵ دقیقه Extension در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک بررسی شد. نتایج به دست آمده، به همراه مشخصات نمونه‌های مورد بررسی جمع‌آوری گردید و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### یافته‌ها

از مجموع ۱۸۸ نمونه‌ی بالینی جمع‌آوری شده، تعداد ۹۱ (۴۸/۴ درصد) ایزوله‌ی *Pseudomonas aeruginosa* شناسایی شد. بیماران مورد بررسی از سن ۶۹-۱۵ سال و با میانگین سنی ۱۰/۰ ± ۳۲/۶ سال بودند. از این تعداد ایزوله، ۵۱ مورد (۵۶/۱ درصد) در مردان و ۴۰ مورد (۴۳/۹ درصد) در زنان بود.

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت تعداد (درصد)	حساسیت حد واسط تعداد (درصد)	میزان حساسیت تعداد (درصد)
جنتامایسین	۶۶ (۷۲/۶)	۴ (۴/۴۰)	۲۱ (۲۳/۰۰)
پیراسیلین	۶۳ (۶۹/۲)	۲ (۲/۲۰)	۲۶ (۲۸/۶)
آمیکاسین	۶۹ (۷۵/۸)	۰ (۰/۰۰)	۲۲ (۲۴/۲)
سفتازیدیم	۶۷ (۷۳/۶)	۶ (۷/۶۰)	۱۸ (۱۹/۷)
سفپیم	۷۷ (۸۴/۶)	۰ (۰/۰۰)	۱۴ (۱۵/۴)
سفوتاکسیم	۸۰ (۸۷/۹)	۰ (۰/۰۰)	۱۱ (۱۲/۱)
سیروفلوکساسین	۶۲ (۶۸/۲)	۱۱ (۱۲/۰۰)	۱۸ (۱۹/۸)
ایمی‌پنم	۵۳ (۵۸/۲)	۳ (۳/۳۰)	۳۵ (۳۸/۵)

جدول ۳. فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلزینات بر اساس تعداد موارد مثبت و منفی در ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa*

ژن‌های مورد بررسی	مجموع	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
اگزوتوکسین A (ETA)	۷۹ (۸۷/۰)	۱۲ (۱۳/۰)
آلزینات (alg D)	۸۸ (۹۶/۷)	۳ (۳/۳)

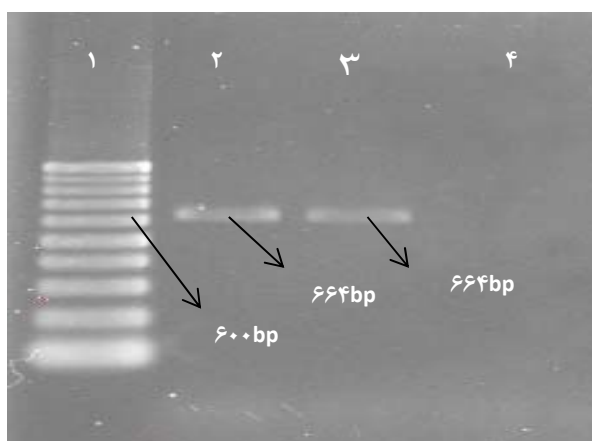
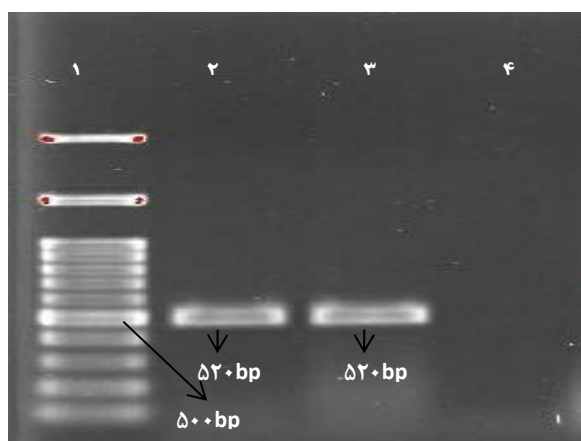
در این مطالعه، ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* فقط از بیماران دچار سوختگی جدا شد. با توجه به این که وجود سطح بالایی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده از بیماران سوختگی در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است، (۲۱، ۱۱)، در این پژوهش نیز میزان بالایی از مقاومت دارویی در بین این ایزوله‌ها مشاهده گردید. یکی از دلایل احتمالی این امر، می‌تواند جداسازی این باکتری‌ها از نمونه‌های سوختگی در بیماران باشد.

بیشترین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این مطالعه در سفوتاکسیم (۸۷/۹ درصد)، سفپیم (۸۴/۶ درصد)، آمیکاسین (۷۵/۸ درصد) و سفنازیدیم (۷۳/۶ درصد) و کمترین میزان مقاومت در ایمپنم (۵۸/۲ درصد) مشاهده گردید. در مطالعه‌ی اخوان تفتی و همکاران (۱۱) بر روی *Pseudomonas aeruginosa*، میزان مقاومت نسبت به جتتامایسین، پیپراسیلین، سفپیم و ایمپنم به ترتیب ۷۳، ۷۰، ۶۲ و ۷۴ درصد گزارش شد. با توجه به این که در این مطالعه نیز نمونه‌ها فقط از بیماران سوختگی جدا شده بود، نتایج این مطالعه، با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. در نتیجه، می‌توان گفت که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری در بیماران بستری در بیمارستان‌ها به خصوص افراد دچار سوانح سوختگی در حال افزایش می‌باشد.

از جمله دیگر عوامل مهم در بیماری‌زایی *Pseudomonas aeruginosa* آلزینات است که با جلوگیری از دسترسی سیستم ایمنی میزبان، باعث افزایش توان بیماری‌زایی این پاتوژن فرصت طلب می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ۸۸ ایزوله (۹۶/۷ درصد) از مجموع

بیشترین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این مطالعه در سفوتاکسیم (۸۷/۹ درصد)، سفپیم (۸۴/۶ درصد)، آمیکاسین (۷۵/۸ درصد) و سفنازیدیم (۷۳/۶ درصد) و کمترین میزان مقاومت در ایمپنم (۵۸/۲ درصد) مشاهده گردید. در مطالعه‌ی اخوان تفتی و همکاران (۱۱) بر روی *Pseudomonas aeruginosa*، میزان مقاومت نسبت به جتتامایسین، پیپراسیلین، سفپیم و ایمپنم به ترتیب ۷۳، ۷۰، ۶۲ و ۷۴ درصد گزارش شد. با توجه به این که در این مطالعه نیز نمونه‌ها فقط از بیماران سوختگی جدا شده بود، نتایج این مطالعه، با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. در نتیجه، می‌توان گفت که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری در بیماران بستری در بیمارستان‌ها به خصوص افراد دچار سوانح سوختگی در حال افزایش می‌باشد.

از جمله دیگر عوامل مهم در بیماری‌زایی *Pseudomonas aeruginosa* آلزینات است که با جلوگیری از دسترسی سیستم ایمنی میزبان، باعث افزایش توان بیماری‌زایی این پاتوژن فرصت طلب می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ۸۸ ایزوله (۹۶/۷ درصد) از مجموع



شکل ۱. نتایج Polymerase chain reaction (PCR) ژن‌های اگزوتوکسین A (ETA) و آلزینات (alg D)

ETA: ۱- نشانگر (۱۰۰ bp)، ۲- شاهد مثبت (۶۶۴ bp)، ۳- نمونه‌ی مثبت (۶۶۴ bp) و ۴- شاهد منفی  
alg D: ۱- نشانگر (۱۰۰ bp)، ۲- شاهد مثبت (۵۲۰ bp)، ۳- نمونه‌ی مثبت (۵۲۰ bp) و ۴- شاهد منفی

هستند و همچنین، تمامی ایزوله‌های مورد بررسی در این پژوهش از بیماران دچار سوختگی جدا شد، می‌توان یکی از دلایل احتمالی این مقاومت‌ها را فراوانی بالای وجود این دو عامل ویروالانس *Pseudomonas aeruginosa* نام برد. با توجه به فراوانی بالای ژن‌های اگزوتوکسین A و آلزینات و همچنین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در ایزوله‌های مورد بررسی، که باعث افزایش قابلیت بیماری‌زایی این ارگانیسم‌ها و به دنبال آن بروز اختلال در روند درمان بیماران می‌شود، شناسایی و تشخیص به موقع این پاتوژن‌های مقاوم، می‌تواند در انتخاب راه‌کارهای مناسب در جهت پیش‌گیری و درمان مناسب آن‌ها مؤثر باشد.

### تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه که هزینه‌ی این طرح را از محل بودجه‌ی طرح جذب پژوهشگر به شماره‌ی ۹۴۴۵۲ تأمین نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

۹۱ ایزوله‌ی *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی، دارای ژن آلزینات می‌باشند. در مطالعات انجام گرفته، میزان فراوانی آلزینات در این باکتری بین ۱۰۰-۸۱/۷ درصد گزارش شده است (۲۸-۲۶). در مطالعه‌ی ولدببگی و همکاران (۱۵)، میزان شیوع ژن آلزینات در مجموع نمونه‌های مورد بررسی ۹۲ درصد بود، اما در تمامی ایزوله‌های جدا شده‌ی *Pseudomonas aeruginosa* از بیماران دچار سوختگی در این مطالعه، همچون مطالعه‌ی پورزرشکی و همکاران (۲۶)، ژن مولد آلزینات وجود داشت.

در مطالعه‌ی حاضر، اغلب ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی، دارای سطح بالایی از مقاومت آنتی‌بیوتیک بودند و درصد زیادی از این باکتری‌ها هر دو ژن اگزوتوکسین A و آلزینات را داشتند. با توجه به این که بیماران دارای سوختگی به علت ضعیف شدن سطح ایمنی بدن و از طرفی نیاز به بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان‌ها در معرض عفونت‌های خطرناک و مقاوم به درمانی

### References

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): e20980.
2. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007; 67(3): 351-68.
3. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – pathogenesis and pathogenic mechanisms. *International Journal of Biology* 2015; 7(2): 44-67.
4. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital from a rural area. *Indian J Med Res* 2005; 121(5): 701-3.
5. Al-Daraghi WA, Abdullah ZH. Detection of exotoxin a gene in *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples. *Journal of Al-Nahrain University* 2013; 16(2): 167-72.
6. Xiao X, Zhang J, Gong J, Pan Y, Yu Y, Yang X, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targeting ETA gene. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2008; 24(4): 581-5. [In Chinese].
7. Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa*--comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3: 21.
8. Hafiane A, Ravaoarino M. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients by different typing methods. *Pathol Biol (Paris)* 2011; 59(5): e109-e114.
9. 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.
10. Amirmozafari N, Fallah Mehrabadi J, Isazadieh K, Habibi A. Molecular analysis of exotoxin A associated with antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients in Tehran hospitals. *Iran J Med Microbiol* 2015; 8(4): 36-43. [In Persian].
11. Akhavan Tafti F, Zandi H, Vakli M, Mousavi SM, Zarei M. Frequency of  $\beta$ -lactamase and metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn wounds in Yazd burn hospital during 2011-2012. *Feyz* 2014; 18(2): 167-74. [In Persian].
12. Wang H, Tu F, Gui Z, Lu X, Chu W. Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Microbiol* 2013; 53(2): 163-7.
13. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005; 4(Suppl 2): 37-43.
14. Clinical Laboratory Standards Institute. M100-S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second international supplement. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2012. p. 50-1.
15. Valadbeigi H, Sadeghifard N, Rafiei Tabatabaei R, Maleki A. A study on the frequency of toxin A, alginate genes, and of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Ilam Univ Med Sci* 2012; 20(1): 58-64. [In Persian].
16. 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. [In Persian].
17. Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. *Iran Red Crescent Med J* 2014; 16(10): e15722.
  18. Yousefi Mashouf R, Esmaceli R, Alikhani MY, Ghanbari M. Evaluation of exotoxin A gene and frequency of polymerase chain reaction sensitivity in detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Tehran Univ Med J* 2014; 72(3): 167-73. [In Persian].
  19. Zavascki AP, Barth AL, Fernandes JF, Moro AL, Goncalves AL, Goldani LZ. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo-beta-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Crit Care* 2006; 10(4): R114.
  20. Ranjan KP, Ranjan N, Bansal SK, Arora DR. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative wound infection in a referral hospital in Haryana, India. *J Lab Physicians* 2010; 2(2): 74-7.
  21. Abdi-Ali A, Nikbin V, Feizabadi MM, Gharavi S, Fallahi Z. Study of Plasmid Profile and Antibiotic Resistance in Hospital *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Biology* 2005; 18(2): 141-9.
  22. Fazeli H, Fatahi Bafghi M, Faghri M, Akbari R. Molecular Study Of PER and VEB genes is multidrug resistant *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from clinical specimens in Isfahan/Iran and their antibiotic resistance patterns. *J Kerman Univ Med Sci* 2012; 19(4): 345-53. [In Persian].
  23. Mirsalehian A, Akbari Nakhjavani F, Bahador A, Jabal ameli F, Bigverdi R, Goli H. Prevalence of MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Tehran Univ Med J* 2011; 68(10): 563-9. [In Persian].
  24. Imani Foolad A, Hosainzadeh M, Mousavi S F. Association between exotoxin A (exo-A) gene and antibiotic resistance pattern with biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ardabil Univ Med Sci* 2011; 11(1): 7-13. [In Persian].
  25. Amini B, Kamali M, Zarei Mahmood abadi A, Mortazavi Y, Ebrahim habibi A, Bayat E, et al. Cloning of catalytic domain of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Zanjan Univ Med Sci* 2010; 18(71): 24-33. [In Persian].
  26. Pourzereshki N, Naserpour Farivar T, Peymani A. Presence of alginate among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples in Qazvin and Tehran hospitals. *J Clin Res Paramed Sci* 2015; 3(4): 257-63. [In Persian].
  27. Rashno TS, Khansarinejad B, Abtahi H, Najafimosleh M, Ghaznavi-Rad E. Detection of algD, oprL and exoA Genes by new specific primers as an efficient, rapid and accurate procedure for direct diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* strains in clinical samples. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(10): e13583.
  28. Stehling EG, Silveira WD, Leite DS. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Braz J Infect Dis* 2008; 12(1): 86-8.

## Molecular Study of the Prevalence of Exotoxin A and Alginate Gene in Pseudomonas Aeruginosa Isolates in Burn Wounds Samples

Seyed Hamidreza Mortazavi<sup>1</sup>, Mehdi Ghaderi<sup>2</sup>, Mitra Hemmati<sup>3</sup>, Siavash Vaziri<sup>4</sup>, Mohsen Azizi<sup>5</sup>, Mahsa Kashef<sup>5</sup>, Kamal Ahmadi<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Pseudomonas aeruginosa is one of the major nosocomial pathogens with a vast antibiotic resistance and great ability in adaptation with environment. The purpose of this study was to evaluate the antibiotic resistance and bacterial detection using Exotoxin A (ETA) and algD genes in patients with burns wound infection.

**Methods:** In this study, 188 samples were evaluated with standard bacteriological methods. After antibiotic resistance evaluation with disc diffusion method (Kirby-Bauer), specific primers for detection of algD and ETA genes among bacterial isolate were used. All data were analyzed using SPSS software.

**Findings:** From 188 taken samples, 91 isolates were Pseudomonas aeruginosa. The antibiotic resistance rate for cefotaxime, cefepime, amikacin, ceftazidime, gentamicin, piperacillin, ciprofloxacin and imipenem were 80 (87.9%), 77 (84.6%), 69 (75.8%), 67 (73.6%), 66 (72.6%), 63 (69.2%), 62 (68.2%) and 53 (58.2%), respectively. The prevalence of algD and ETA genes were 88 (96.7%) and 79 (87.0%), respectively.

**Conclusion:** The high prevalence of algD and ETA genes among burns wound infections demonstrates the increase in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa and problems with burn wound infection treatment. Therefore, accurate and rapid diagnosis of resistant Pseudomonas aeruginosa can be useful in taking proper strategy for prevention and treatment of such infections.

**Keywords:** Pseudomonas aeruginosa, algD gene, Exotoxin A (ETA) gene

**Citation:** Mortazavi SH, Ghaderi M, Hemmati M, Vaziri S, Azizi M, Kashef M, et al. **Molecular Study of the Prevalence of Exotoxin A and Alginate Gene in Pseudomonas Aeruginosa Isolates in Burn Wounds Samples.** J Isfahan Med Sch 2017; 34(412): 1537-43.

1- Assistant Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2- Department of Microbiology, School of Science, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran

3- Associate Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

4- Associate Professor, Department of Infectious Disease, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

5- Department of Microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

**Corresponding Author:** Kamal Ahmadi, Email: kamal.ahmadi55@yahoo.com