Archive of SID

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز، زمستان ۱۳۹۹، سال ۱۰، شماره ۱، صفحه‌های ۸۹-۱۰۴
مقاله تحقیقی

بررسی فراوانی ژنهای حدت اگزوتوکسین A، اگزوآنزیم، آلژینات و *oprI* و *oprL* در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* دامی و انسانی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

علیرضا مختاری[1*]، تقی زهرایی صالحی[2]، احسان استبرقی[3]

[1] مسئول فنی بخش میکروبشناسی، آزمایشگاه دامپزشکی آتیه، شرکت دانش بنیان تامین آتیه سلامت البرز، البرز، ایران
[2] استاد، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران
[3] استادیار، گروه دامپزشکی، واحد شهربابک، دانشگاه آزاد اسلامی، شهربابک، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۱۰/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۱

چکیده

زمینه و اهداف: *سودوموناس آئروژینوزا* مهمترین عامل عفونت‌های مختلف بیمارستانی و ورم پستان در گاوهای شیری و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی محسوب می‌شود. هدف این مطالعه تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و حضور ژنهای‌حدت در نمونه‌های انسانی و دامی بوده است.

مواد و روش کار: در این تحقیق ۱۰۲ سویه انسانی و دامی از *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی عوامل حدت باروش Multiplex PCR جهت تشخیص ژن‌های اختصاصی استفاده شد. همچنین آزمایش دیسک دیفیوژن و E-test بر اساس روش CLSI با آنتی‌بیوتیکهای مختلف انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج آنتی‌بیوگرام جدایه‌های انسانی *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و سفپیم (۱۰۰ ٪)، و بیشترین میزان مقاومت در جدایه‌های دامی نسبت به آمپی‌سیلین (۱۰۰٪) وجود دارد. شیوع ژن*oprI* در ۱۰۰ درصد جدایه‌های انسانی شناسایی و تمام نمونه‌ها از نظر وجود ژن *alg-D* منفی بودند. برخلاف نمونه‌های انسانی، تمامی نمونه‌های دامی از نظر وجود اگزوآنزیم S منفی بوده و فقط اگزوآنزیم Y در ۱۵جدایه (۲۵٪) شناسایی شد. در جدایه‌های انسانی اگزوآنزیم T از بیشترین فراوانی برخوردار بود. به گونه ای که ۱۰۰٪ نمونه‌ها از نظر این اگزوآنزیم مثبت بودند.

بحث: شیوع بالای ژنهای حدت در بین ایزوله‌های انسانی و دامی و توجه به عملکرد این ژن‌ها، شناسایی تاثیر بر بافت‌های دامی و انسانی را ضروری می‌سازد. با توجه به بالا بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های دامی و انسانی، مصرف مناسب و به اندازه آنتی بیوتیک‌ها می‌بایست رعایت گردد.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا* ، Multiplex-PCR ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، آلژینات، اگزوتوکسین

نویسنده مسئول:
مسئول فنی بخش میکروبشناسی، آزمایشگاه دامپزشکی آتیه، شرکت دانش بنیان تامین آتیه سلامت البرز، البرز، ایران

۰۹۱۹۶۹۷۷۵۲۲
E-mail: alm3370@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جنس سودوموناس از گروه‌های بزرگ باکتری‌ها بوده که بیش از ۸۰ گونه از آن تاکنون شناخته شده است. این باکتری شیمو ارگانوتروف بوده ولی برخی از انواع نیز شیمولیتوتروف اختیاری بوده و قادرند هیدروژن و دی اکسید کربن را به عنوان منابع انرژی به کار برند. در سال ۱۸۵۰، سدیلوت (Sedillot) ترشحات چرک سبز-آبی را در زخم‌های جراحی گزارش کرد که این زخم‌ها بسیار دیر بهبود می‌یافت. محققین ۱۰ پمپ پروتئینی را روی غشای خارجی *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی کرده‌اند که مقاومت باکتری را در برابر دترجنت‌ها و آنتی بیوتیک‌ها به آنها نسبت می‌دهند[۱،۲]. این باکتری دارای قدرت آنزیمی فوق العاده‌ای بوده که امکان بقای آن را در شرایط مختلف فراهم می‌سازد. بیماریزایی *سودوموناس آئروژینوزا* به علت تولید چندین فاکتور حدت همراه سلول و فاکتورهای خارج سلولی است. لیپوپلی ساکارید خاصیت اندوتوکسینی دارد و پیوسیانین تولید اشکال سمی اکسیژن مانند سوپراکسید و هیدروژن پراکسید را کاتالیز می‌کند[۳]. *سودوموناس آئروژینوزا* مانند باکتری‌های گرم منفی دیگر، دارای سیستم ترشحی تیپ III می باشد. فاکتورهای این سیستم ترشحی شامل چهار اگزوآنزیم می‌باشد که ExoS، ExoT، ExoU و ExoY است. ژنهای مربوط به آنها تقریبا در اکثر ایزوله‌های بالینی و محیطی وجود داشته و در میان این چهار آنزیم، ExoS از بقیه مهم تر و اگزوآنزیم S مانند اگزوتوکسین A دارای فعالیت ADP - ریبوزیل ترانسفرازی است ولی سوبسترای آن به جای EF-۲ یک پروتئین فیلامنتوس به نام ویمنتین می‌باشد. مشخص شده است سویه‌های فاقد ژن *ExoS* در مدل حیوانی کمتر ویرولانس بوده *ExoT* هم دارای فعالیت *ADP* - ریبوزیل ترانسفرازی بوده و *ExoU* نوعی فسفولیپاز ولی *ExoY* نقش آدنیلات سیکلازی دارد[۴]. *سودوموناس آئروژینوزا* به شدت با بیماران سرطانی و سوختگی در انسان و افرادی که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده است ارتباط دارد. میزان مرگ برای افراد مبتلا به این باکتری حدود ۵۰ درصد است .باکتری ایجادعفونت گوش میانی (Swimmers ear)، پوستی (بخصوص درافراد دچار سوختگی)، باکتریمی، عفونت مغز استخوان و مفاصل، منتژیت و آبسه‌های مغزی، کراتیت، انتروکولیت، تب شانگهای (مشابه حصبه)، اندوکاردیت، پنومونی و عفونت مجاری ادراری می‌کند. فقط در آبسه‌ها سودوموناس نبوده چون هوازی اجباری است[۵]. مقاومت ذاتی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیکها به دلیل حضور پروتئین‌های اختصاصی موجود در غشای خارجی این باکتری می-باشد. دو لیپوپروتئین موجود در غشای خارجی شامل ژن‌های oprI و oprL است که با تاثیر بر روی سیستم انتشار دارو و ناتراوایی در غشای سلول باکتری موجب ایجاد مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا می‌گردد. شناسایی این دو ژن در این باکتری هم موجب تفکیک باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از سایر گونه‌های سودوموناس شده و هم از جهت بررسی مقاومت در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* دارای اهمیت می‌باشد[۶]. در دامها این باکتری از عوامل بیماریزای مقاوم به درمان بوده که ضررهای اقتصادی بالایی را به صنعت دامپروری وارد می‌کند. *سودوموناس آئروژینوزا*، به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده ورم پستان‌های کلینیکی با شیوع ناگهانی در گاوهای شیری مطرح است. این باکتری کمتر از ۱٪ و یا بیشتر از ۳٪ گله را درگیر کرده و موجب ورم پستان‌های مزمن تحت بالینی می‌شود[۷]. *سودوموناس آئروژینوزا* در آمریکا بیش از ۲ بیلیون دلار، انگلستان ۹۳ میلیون یورو و در استرالیا ۱۰۰ میلیون دلار سالانه ضرر اقتصادی را به دامداران تحمیل می‌کند[۸]. بیماری ورم پستان کلینیکی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* در اثر عواملی مانند آب آلوده، ضدعفونی نامناسب کارتیه‌ها و درمان نامناسب در دوران خشکی ایجاد می‌گردد و کارتیه‌های گاو به عنوان مخزن انتقال باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* عمل می‌نماید. ورم پستان حاد ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* معمولاً به عفونت مزمن تبدیل شده و حتی گانگرونوز حاد در ۱۰٪ موارد ابتلا به ورم پستان گزارش شده است. آنزیم‌های تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در شیر در دمای پاستوریزاسیون باقی مانده و موجب تخریب چربی شیر و محصولات لبنی می‌گردد[۷]. دی‌ووس و همکاران با روش Multiplex PCR ژن های *oprI* و *oprL* *سودوموناس آئروژینوزا* را در نمونه‌های کلینیکی شناسایی نموده و به نقش این دو ژن در ایجاد مقاومت در این باکتری اشاره نموده‌اند. در کلیه نمونه‌های بالینی و محیطی مورد بررسی، این دو ژن شناسایی شده و میزان حساسیت این روش را ۱۰۰٪ و ویژگی ۷۴٪ در مقایسه با روش

www.SID.ir

Archive of SID

کشت اعلام نمودند[۹]. اگزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا*، یکی از معدود توکسین‌های باکتریایی است که مکانیسم عملش در سطح مولکولی مشخص شده است. چون اگزوتوکسین A، دارای خواص متوقف‌سازی سنتز پروتئین می‌باشد، می‌تواند در ساخت ایمونوتوکسین‌ها استفاده گردد. این ترکیب برای ماکروفاژهای انسانی سیتوتوکسیک بوده و از پاسخ دهی سلول‌های طحال موش هم ممانعت به عمل می‌آورد. از فعالیت سلولهای تک هسته‌ای انسانی جلوگیری کرده و جلوی فعالیت پروجنیتورهای گرانولوسیت–ماکروفاژ را در مغز استخوان انسان می‌گیرد[۱۰]. سنا حسین در سال ۲۰۱۳، ژنهای *Exot A* و *oprI* را در نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های بالینی مورد بررسی قرار داد، که در نتایج این تحقیق تمام نمونه‌ها دارای ژن *oprI* بوده ولی ۸۰٪ نمونه‌ها واجد ژن *Exot A* بودند و استفاده از روشهای ملکولی را برای تعیین تولید توکسین موثر اعلام نمود[۱۱]. Feltman و همکاران *exoS* را در ٦٧ (۷۱٪) از ۹۵ سویه بالینی مورد بررسی شناسایی نمودند. این نتایج در مقایسه با گزارشات قبلی که حضور ژن *exoS* را در تمام سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* منفی اعلان کرده بودند، تفاوت دارد. با این حال، برآورد شیوع واقعی این ژن یا تولید *ExoS* به طور قابل توجهی متفاوت است[۱۲]. آلژینات امکان بقا و حالت تهاجمی *سودوموناس آئروژینوزا* را با استفاده از چندین استراتژی افزایش می‌دهد، به عنوان یک سد حفاظتی برای سلول‌های باکتری در مقابل فاگوسیت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها عمل می‌کند، دلیل این ویژگی خصوصیت اسیدی این پلیمر و توانایی به دام انداختن آنتی بیوتیکهای کاتیونی است و همچنین می‌تواند رادیکال‌های اکسیداتیو که توسط سلولهای فاگوسیت رها می‌شوند را فروبنشاند. آلژینات دارای ۱۲ ژن از جمله *algA* و *algD* می‌باشد و این ژنها تحت کنترل پروموتر آلژینات D قرار دارند. ژنهای *algA*, *algC* و *algD* آنزیم‌های لازم برای بیوسنتز پیشرو آلژینات GDP–مانورونیک اسید را رمزدهی می‌کنند. ژنهای *algX*; *algK*; *alg44* و *alg8*; در پلیمریزاسیون، ژنهای *algJ*; *algF*; *algG* *algL* و *algI*; در تغییرات و ژن *algE* در خروج آلژینات از غشای خارجی دخالت دارند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و انتقال نمونه

در این مطالعه توصیفی– مقطعی که در بازه زمانی بین تابستان ۱۳۹۳ تا آذر ماه ۱۳۹٦ به طول انجامید، تعداد ۵۱ مورد نمونه‌های انسانی (خلط، خون، ادرار، ترشحات زخم) از مراکز درمانی بیمارستانی تهران که مشکوک به سودوموناس بوده و ۵۱ نمونه‌های دامی از شیر خام دامداری های مختلف استان تهران که دارای علائم ورم پستان بودند، جمع‌آوری و با انتقال به آزمایشگاه، کشت ابتدایی بر روی نمونه‌ها انجام شد. برای کشت از محیط های بلاداگار و مک‌کانکی آگار و ستریمیداگار (مرک، آلمان) استفاده و بعد از انکوباسیون به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد، کلونی‌های رشد یافته از نظر مورفولوژی و تولید رنگدانه بررسی و پس از رنگ‌آمیزی گرم، باکتری های لاکتوز منفی برای انجام آزمون های تاییدی خالص سازی شدند. آزمون های اکسیداز و کشت بر روی محیط TSI (مرک، آلمان)، تست اوره‌آز، سیمون سیترات جهت تایید باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد[۱۳].

آنتی‌بیوگرام

بعد از تایید نهایی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده، نمونه‌ها بر روی محیط مولرهینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تجاری از شرکت Himedia (Laboratories Pvt.Limited-India) تهیه گردید. این دیسک‌ها شامل سیپروفلوکساسین (µg ۵)، آمیکاسین (µg ۳۰)، سفتریاکسون (µg ۳۰)، سفتازیدیم (µg ۳۰)، آمپی سیلین (µg ۱۰)، سفپیم (µg ۳۰)، ایمی پنم(µg ۱۰)، جنتامایسین (µg ۱۰)، کانامایسین (µg ۳۰)، مروپنم (µg ۱۰) و تتراسایکلین (µg ۳۰) و انروفلوکساسین (µg ۱۰) بود که بعد از قرار دادن بر روی محیط مولر هینتون، به مدت ٢٤ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. بعد از گرمخانه‌گذاری، نتایج قرائت و قطرهاله عدم رشد و مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک براساس جدول Clinical and Laboratory (CLSI) Standards Institute ثبت گردید[١٤].

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین میزان کمترین غلظت ممانعت از رشد MIC به روش E.test

جهت انجام آزمایش تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC (Minimum Inhibitory Concentration) از روش E.test (Epsilometer test) استفاده گردید. این آزمایش بر روی نمونه‌های انسانی با آنتی‌بیوتیکهای آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، مروپنم، ایمی‌پنم و سفپیم تهیه شده از شرکت HIMEDIA Himedia Laboratories (Pvt.Limited-INDIA) انجام شد. برای انجام این تست بر روی نمونه‌های دامی با آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین انجام گردید. در این مطالعه از نوارهای E.test از نوع Strip (نواری) و Comb (شانه‌ای) استفاده شد. در روش E.test پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی به روش نیم مک فارلند برای نمونه‌های مورد مطالعه، با سوآپ استریل بر روی پلیت مولر هینتون آگار کشت داده و سپس نوارهای را که هرکدام معرف یک نوع آنتی بیوتیک بوده بر روی آگار قرار داده و پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه منطقه عدم رشد که به شکل گلابی شکل ایجاد شده بود را در حدفاصل کمترین نقطه تماس با نوار آنتی‌بیوتیکی قرائت شد[۱۵].

استخراج DNA باکتری

برای استخراج DNA باکتری از کیت تجاری MBST (Molecular Biology Transfer System) جهت استخراج DNA استفاده نموده و پس از استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه-سانتی‌گراد تا انجام آزمونهای ملکولی ذخیره گردید. همچنین پرایمرهای مورد نیاز این طرح شامل پرایمر *Exot A*، اگزوآنزیمS و آلژینات و پرایمر ژنهای *oprI* و *oprL* (طبق جداول ۱ و ۲) به شرکت (تکاپوزیست) سفارش داده شد[۱۶]. بعد از انجام روند آزمون و انتقال محصول به روی ژل و مشاهده در دستگاه داده‌ها آنالیز گردید.

برنامه زمانی و میزان مخلوط واکنش Multiplex-PCR ژنهای حدت

برنامه آزمون Multiplex-PCR: مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۰ ثانیه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (تعداد ۳۵ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد. مخلوط‌های استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می‌باشد: آب مقطر ۳/۵ میکرولیتر، Mix Master شرکت Amplicon به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هرکدام ۰/۵ میکرولیتر، نمونه DNA ٤ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید[۱۷].

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق برای شناسایی ژنهای حدت [۱۷]

جدول پرایمرهای مورد استفاده			
اندازه باند (bp)	ژن هدف	توالی پرایمر **(5’ to 3’)**	پرایمر
۳۹٦	*ETA*	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC	ETA-F
۳۹٦	*ETA*	CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	ETA-R
۵۰٤	*oprL*	ATG GAAATGCTGAAATTCGGC	oprL-F
۵۰٤	*oprL*	CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	oprL-R
۲٤۹	*oprI*	ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCTGCT	oprI-F
۲٤۹	*oprI*	CTTGCGGCTGGCTTTTTCCAG	oprI-R
۵۲۰	*Alg*	TTCCCTCGCAGAGAAAACATC	Alg-F
	Alg	CCTGGTTGATCAGGTCGATCT	Alg-R

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مشخصات پرایمرها جهت تکثیر ژن‌های اگزوتوکسین جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا [۱۸]

طول قطعه bp	توالی DNA پرایمر	ژن تکثیر یافته
۱۱۸	F, (5′-GCG AGG TCA GCA GAG TAT CG-3′) R, (5′-TTC GGC GTC ACT GTG GAT GC-3′)	*exo S*
۱۵۲	F, (5′-AAT CGC CGT CCA ACT GCA TGC G-3′) R, (5′-TGT TCG CCG AGG TAC TGC TC-3′)	*exo T*
۱۳٤	F, (5′-CCG TTG TGG TGC CGT TGA AG-3′) R, (5′-CCA GAT GTT CAC CGA CTC GC-3′	*exo U*
۲۸۹	F, (5′-CGG ATT CTA TGG CAG GGA GG-3′) R, (5′-GCC CTT GAT GCA CTC GAC CA-3′	*exo Y*

برنامه زمانی و میزان مخلوط واکنش PCR جهت شناسایی تکثیر ژن‌های اگزوتوکسین جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

برنامه آزمون Multiplex-PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ٤۰ ثانیه، مرحله بسط ٦۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (تعداد ۳٦ سیکل)، مرحله بسط نهایی ٦۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه می‌باشد. مخلوط‌های استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می‌باشد: آب مقطر ٦/۵ میکرولیتر، Mix Master شرکت Amplicon به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هرکدام ۰/۵ میکرولیتر، نمونه DNA ۲ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید[۱۸].

نتایج

بعد از جمع آوری تعداد ۱۰۲ نمونه‌های انسانی و نمونه‌های دامی و انتقال به آزمایشگاه، کشت بر روی محیط های اختصاصی انجام شد و بعد از انکوباسیون به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد، کلونی‌های رشد یافته از نظر مورفولوژی و تولید رنگدانه بررسی و پس از رنگ آمیزی گرم، باکتریهای گرم منفی و لاکتوز منفی برای انجام آزمونهای تاییدی خالص سازی شدند. در نهایت تمامی جدایه‌هایی که وارد مطالعه شدند از نظر الگوی تست‌های افتراقی به صورت زیر مشاهده شدند. در نهایت ۵۱ نمونه انسانی و ۵۱ نمونه دامی شناسایی گردید. کشت برروی محیط ستریمید آگار و براث پیگمان سبز مایل به آبی رانشان داد، هرچند برخی نمونه‌ها پیگمان قرمز هم از خود بروز دادند. تست سیترات تمامی جدایه‌ها مثبت و تست اندول تمامی جدایه‌ها منفی و تستVP تمامی جدایه‌ها منفی و تست متیل رد وتست اکسیداز تمامی جدایه‌ها مثبت و تست کاتالاز تمامی جدایه‌ها مثبت و تمامی جدایه‌ها در محیط کشت ستریمید رشد و تولید پیگمان کردند. جدایه‌ها بعد از رشد در محیط TSI به صورت ALK/ALK مشاهده شدند. آزمون اوره تمامی جدایه‌ها شناسایی شده مثبت گزارش گردید.

نتایج Multiplex-PCR جدایه‌های انسانی از نظر اگزوآنزیم‌های *S,U,Y,T*

در جدایه‌های انسانی *سودوموناس آئروژینوزای* بررسی شده در این مطالعه از نظر وجود ژنهای اگزوآنزیم‌های *Y* با طول باند ۲۸۹ bp، *U* با طول باند ۱۳٤ bp، *T* با طول باند ۱۵۲ bp و *S* با طول باند ۱۱۸ bp، اگزوآنزیم *T* از بیشترین فراوانی برخوردار بود. به گونه‌ای که ۱۰۰ ٪ نمونه‌ها از نظر این اگزوآنزیم مثبت بودند (شکل ۱). فراوانی و درصد هر یک از اگزوآنزیم‌های بررسی شده در نمودار ۱ آمده است.

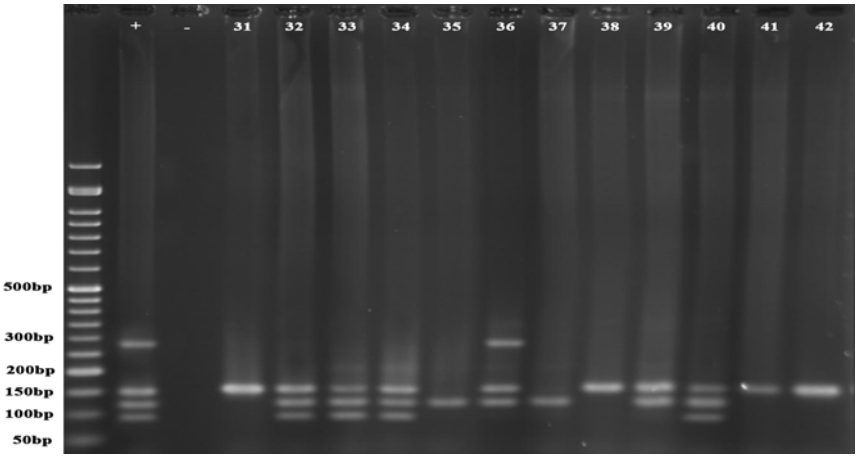
نتایج Multiplex-PCR جدایه‌های دامی از نظر اگزوآنزیم‌های *S,U,Y,T*

برخلاف نمونه‌های انسانی، فراوانی این اگزوآنزیم‌ها در نمونه‌های دامی خیلی کمتر بوده است (شکل ۲). تمامی نمونه‌ها از نظر وجود اگزوآنزیم *S* منفی بودند و فقط اگزوآنزیم *Y* در ۱۵ جدایه (۲۵٪) و اگزوآنزیم *U* و *T* در (٦۸/٦٪) شناسایی شد (نمودار ۲).

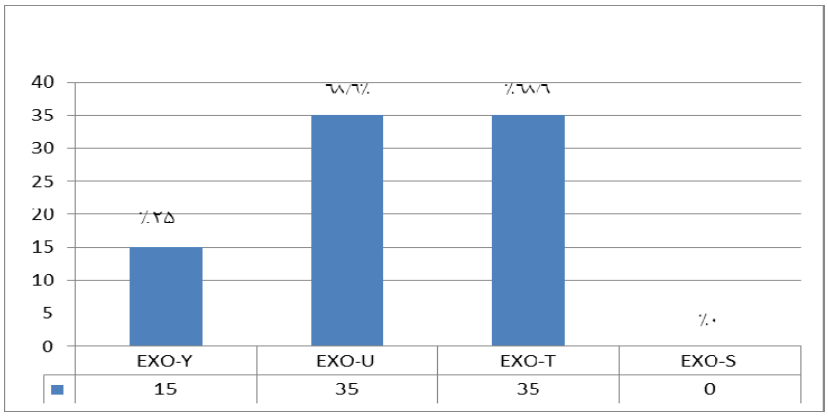
www.SID.ir

Archive of SID

نمودار ۱: فراوانی اگزوآنزیم‌های *Y*، *U*، *T* و *S* در ۵۱ جدایه انسانی *سودوموناس آئروژینوزا* بر حسب تعداد و درصد



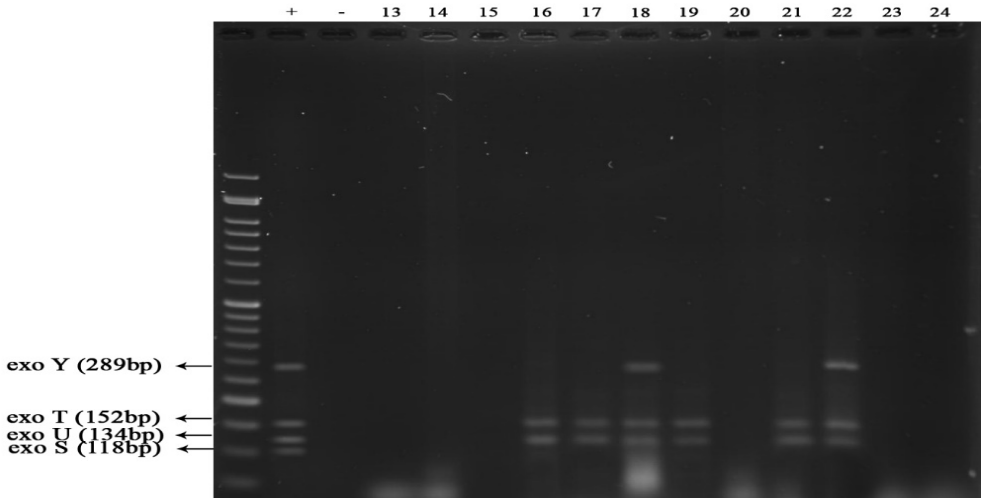
شکل ۱: نتایج Multiplex- PCR جهت شناسایی ژنهای اگزوآنزیم‌های Y با طول باند ۲۸۹ bp، U با طول باند ۱۳٤ bp، T با طول باند ۱۵۲ bp و S با طول باند ۱۱۸ bp، در نمونه‌های انسانی – شماره گودهها به ترتیب از چپ به راست: چاهک اول نشانگر ۵۰ bp، چاهک دوم کنترل مثبت، چاهک سوم کنترل منفی، چاهک ۳۱ تا ٤۲ نمونه‌های انسانی واجد ژنهای مختلف



نمودار ۲: فراوانی اگزوآنزیم‌های Y، U، T و S در ۵۱ جدایه دامی *سودوموناس آئروژینوزا* بر حسب تعداد و درصد

www.SID.ir

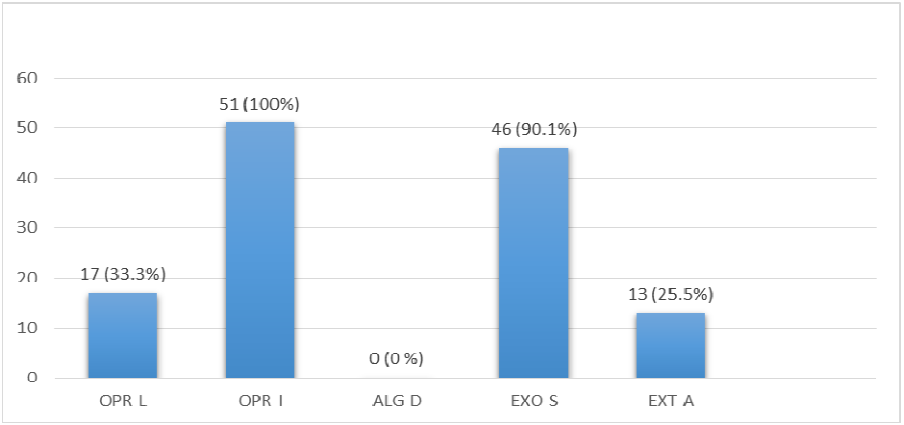
Archive of SID



شکل ۲: نتایج Multiplex- PCR جهت شناسایی ژنهای اگزوآنزیم‌های Y با طول باند ۲۸۹ bp، U با طول باند ۱۳٤ bp، T با طول باند ۱۵۲ bp و S با طول باند ۱۱۸ bp، در نمونه‌های دامی – شماره گودهها به ترتیب از چپ به راست: چاهک اول نشانگر ۵۰ bp، چاهک دوم کنترل مثبت، چاهک سوم کنترل منفی، چاهک ۱۳ تا ۲٤ نمونه‌های دامی واجد ژنهای مختلف

نتایج Multiplex-PCR جدایه‌های انسانی از نظر وجود ژنهای *OPR-L*، *OPR-I*، *ALG-D*، *EXO-S* و *EXT-A*

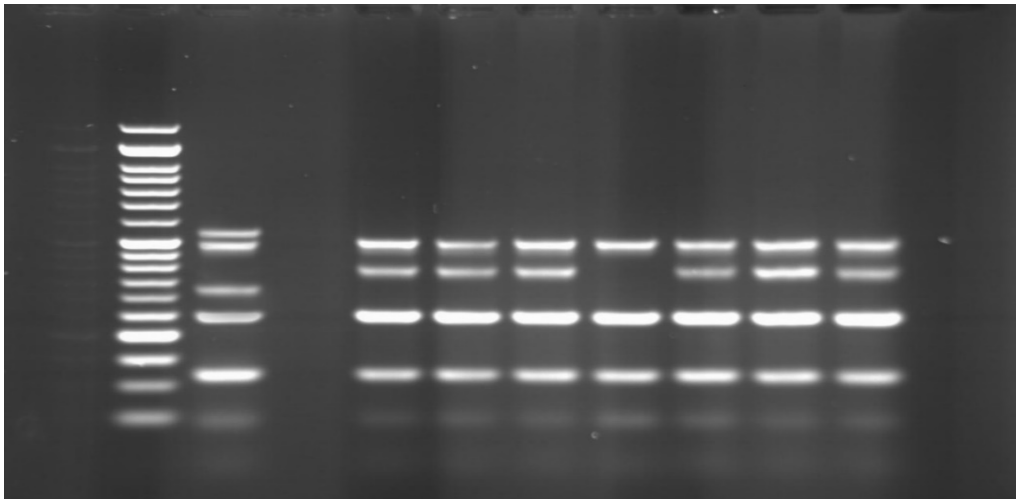
بر اساس نتایج به دست آمده، شیوع ژن *OPR-I* بیشتر از سایر ژن‌ها بوده و در ۱۰۰ درصد جدایه‌های انسانی *سودوموناس آئروژینوزای* بررسی شده وجود داشت. با این حال تمام نمونه‌ها از نظر وجود ژن *ALG-D* منفی بودند (شکل ۳). فراوانی سایر ژنها بر اساس نتایج بدست آمده در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۳: فراوانی ژنهای *OPR-L*، *OPR-I*، *ALG-D*، *EXO-S* و *EXT-A* در ۵۱ جدایه انسانی *سودوموناس آئروژینوزا*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: نتایج Multiplex- PCR جهت شناسایی ژنهای ژنهای OPR-L با طول باند bp ٥٠٤، OPR-I با طول باند bp ٢٤٩، ALG-D با طول باند bp ٥٢٠، EXO-S با طول باند bp ١١٨ و EXT-A با طول باند bp ٣٩٦، در نمونه‌های انسانی، – شماره گودهها به ترتیب از چپ به راست: چاهک اول نشانگر ٥٠ bp، چاهک دوم کنترل مثبت، چاهک سوم کنترل منفی، چاهک چهارم تا دهم نمونه‌های انسانی واجد ژنهای مختلف

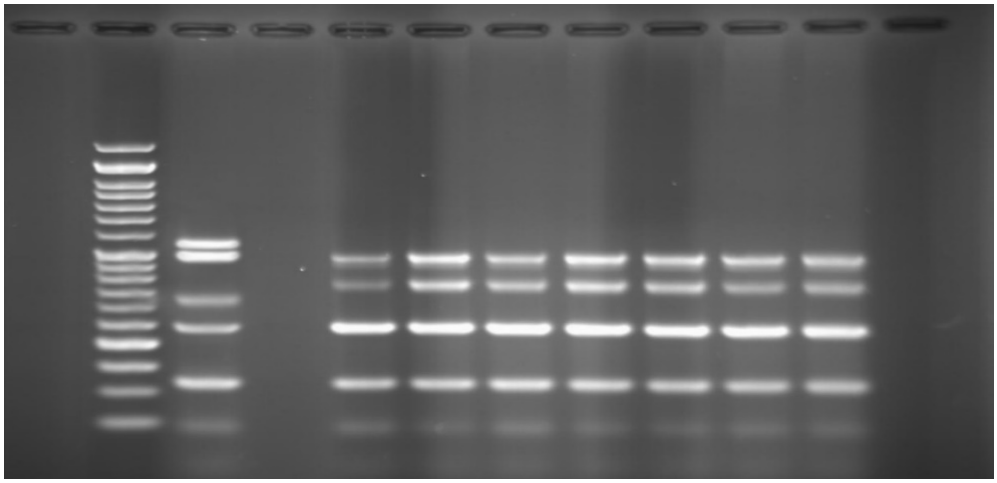
نتایج Multiplex-PCR جدایه‌های دامی از نظر وجود ژنهای *OPR-L*، *OPR-I*، *ALG-D*، *EXO-S* و *EXT-A*

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی‌های انجام شده، شیوع ژن *OPR-I* بیشتر از سایر ژنها بوده و در ۱۰۰ درصد جدایه‌های دامی *سودوموناس آئروژینوزای* بررسی شده وجود داشت (شکل ٤). با این حال تمام نمونه‌ها از نظر وجود ژن *ALG-D* منفی بودند. فراوانی سایر ژنها بر اساس نتایج بدست آمده در نمودار ٤ نشان داده شده است.

نمودار ٤: فراوانی ژنهای OPR-L، OPR-I، ALG-D، EXO-S و EXT-A در ۵۱ جدایه دامی *سودوموناس آئروژینوزا*

www.SID.ir

Archive of SID

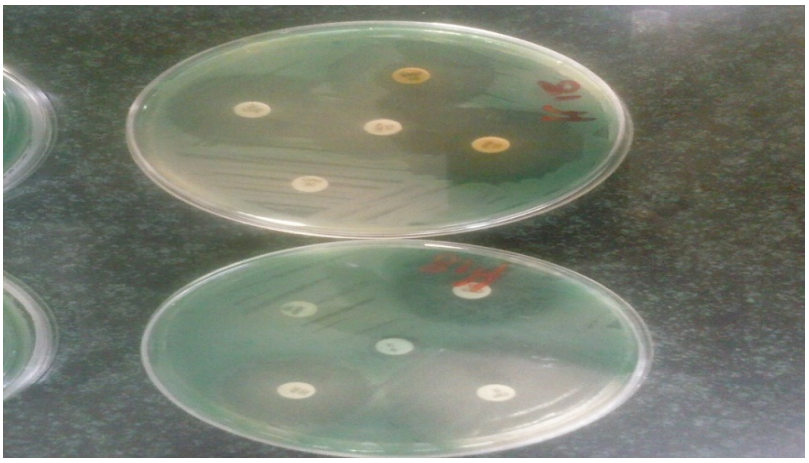


شکل ٤: نتایجMultiplex- PCR جهت شناسایی ژنهای ژنهای OPR-L با طول باند bp ٥٠٤، OPR-I با طول باند bp ٢٤٩، ALG-D با طول باند bp ٥٢٠، EXO-S با طول باند bp ١١٨ و EXT-A با طول باند bp ٣٩٦، در نمونه‌های دامی – شماره گوده‌ها به ترتیب از چپ به راست: چاهک اول نشانگر bp ٥٠، چاهک دوم کنترل مثبت، چاهک سوم کنترل منفی، چاهک چهارم تا دهم نمونه‌های دامی واجد ژنهای مختلف

نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های انسانی

الگوی حساسیت و مقاومت ۵۱ جدایه انسانی *سودوموناس ائزوژینوزا* نسبت به ۱۰ آنتی بیوتیک مختلف با روش دیسک دیفیوژن پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون لازم، قرائت و ثبت گردید. (شکل ۵) بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و سفپیم (۱۰۰ ٪ مقاوم)، و کمترین میزان آن نسبت به داروی آمیکاسین (۹/۹ ٪) مشاهده شد. بیشترین میزان حساسیت نیز به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین با ۸۰/۳٪ قرائت شد(جدول ۳).

بر اساس نتایج تست آنتی بیوگرام، مقاومت همزمان به بیش از یک دارو نیز مشاهده شد. مقاومت همزمان به ۳ آنتی بیوتیک (کانامیسین، آمپی سیلین، سفپیم) شایعترین حالت بوده که در ١٦ جدایه مشاهده گردید. همچنین ۲ جدایه نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده مقاومت نشان دادند. این در حالی است که حساسیت نسبت به تمام آنتی بیوتیک‌های بررسی شده در هیچ یک از جدایه‌ها وجود نداشت (نمودار ۵).



شکل ۵: نمونه ای از نتایج تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار پس از انکوباسیون

www.SID.ir

Archive of SID

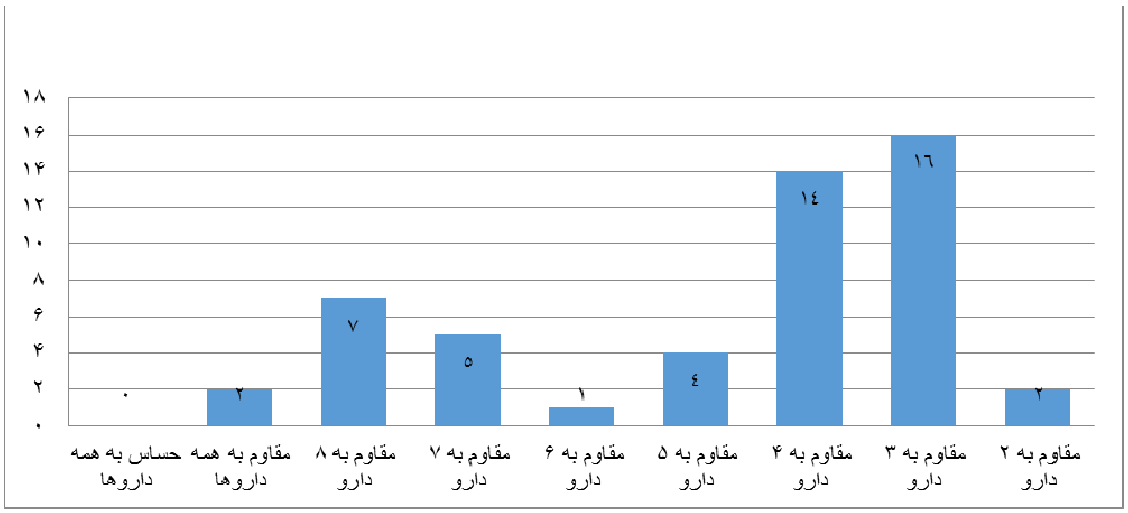
جدول ۳: میزان حساسیت جدایه‌های انسانی *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف با روش دیسک دیفیوژن برحسب تعداد و درصد

نوع آنتی بیوتیک	میزان مقاومت (٪) Resistance	حساسیت متوسط(٪) Intermediate	میزان حساسیت (٪) Sensitive
مروپنم	۱۵ (۲۹/۵)	۱ (۱/۹)	۳۵ (۶۸/۶)
ایمی‌پنم	۷ (۱۳/۹)	۸ (۱۵/۶)	۳۶ (۷۰/۵)
سفتریاکسون	۳۱ (۶۱)	٤ (۷/۸)	۱۶ (۳۱/۲)
سیپروفلوکساسین	۱۱ (۲۱/۷)	۳ (۵/۸)	۳۷ (۷۲/۵)
سفتازیدیم	۱٤ (۲۷/۶)	۲ (۳/۸)	۳۵ (۶۸/۶)
آمپی‌سیلین	۵۱ (۱۰۰)	–	–
سفپیم	۵۱ (۱۰۰)	–	–
کانامایسین	٤۸ (۹٤/۳)	۱ (۱/۹)	۲ (۳/۸)
جنتامایسین	۱۳ (۲۵/۵)	–	۳۸ (۷٤/۵)
آمیکاسین	۵ (۹/۹)	۵ (۹/۸)	٤۱ (۸۰/۳)

نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های دامی

بررسی ۵۱ جدایه دامی *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به ۱۰ آنتی بیوتیک مختلف نشان داد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به داروهای آمپی‌سیلین (۱۰۰٪) وجود دارد. حساسیت کامل (۱۰۰٪) نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم، سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین، جنتامایسین و آمیکاسین مشاهده شد (جدول ٤).

مقاومت همزمان در جدایه‌های دامی نیز مشاهده شد. شایعترین حالت، مقاومت همزمان نسبت به ۳ آنتی بیوتیک (کانامایسین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین) بود که ۲۵ جدایه دامی این حالت را داشتند. مقاومت نسبت به تمام آنتی بیوتیک‌های بررسی شده در هیچ یک از جدایه‌های دامی مشاهده نگردید. (نمودار ٦).



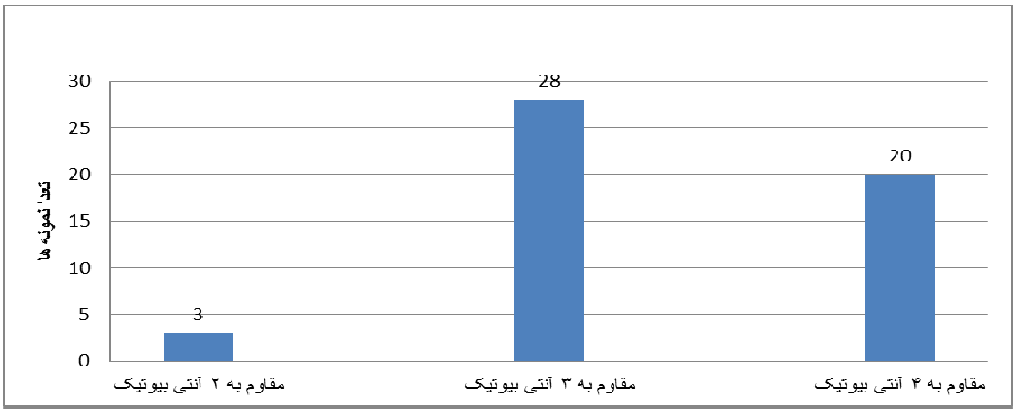
نمودار ۵: فراوانی جدایه‌های انسانی *سودوموناس آئروژینوزا* دارای مقاومت‌های چندگانه

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤: میزان حساسیت سویه‌های دامی *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف با روش دیسک دیفیوژن برحسب تعداد و درصد

نوع آنتی بیوتیک	میزان مقاومت (٪) Resistance	حساسیت متوسط(٪) Intermediate	میزان حساسیت (٪) Sensitive
ایمی‌پنم	–	–	۵۱ (۱۰۰)
سفتریاکسون	۲۳ (٤٥/١)	۳ (٥/٨)	۲۵ (٤٩/١)
سیپروفلوکساسین	–	–	۵۱ (۱۰۰)
تتراسایکلین	٤٨ (٩٤/١١)	۲ (٣/٩٢)	۱ (١/٩٧)
آمپی‌سیلین	۵۱ (۱۰۰)	–	–
انروفلوکساسین	–	–	۵۱ (۱۰۰)
کانامایسین	٤٨ (٩٤/١١)	–	۳ (٥/٨٩)
جنتامایسین	–	–	۵۱ (۱۰۰)
آمیکاسین	–	–	۵۱ (۱۰۰)



نمودار ٦: فراوانی جدایه‌های دامی *سودوموناس آئروژینوزا* دارای مقاومت‌های چندگانه

بحث

در تحقیق حاضر مشخص گردید که میزان آلودگی شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان‌های با ویژگی‌های تحت بالینی ٣٤ درصد بوده که این میزان فراوانی با توجه به نتایج مطالعات فوق همخوانی نداشته که می‌تواند ناشی از منطقه جغرافیایی مورد مطالعه، ضعف مدیریت مزارع، وجود آبهای آلوده و یا مخازن آلوده به این باکتری باشد. به طور کلی گزارش میزان آلودگی و بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و عوامل بیماریزای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در دامهای ایران بسیار کم بوده ولی با توجه به افزایش شیوع و استفاده از آنتی بیوتیکهای مختلف در درمان بدون انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام می‌تواند نقش مهمی در ایجاد سویه‌های مقاوم ایفا نماید. این باکتری از مهمترین عوامل بیماری و مرگ و میر در مبتلایان به فیبروز سیستیک، نئوپلاسمی و سوختگی‌های شدید در انسان است. در دهه‌های اخیر در پی ابداع درمان آنتی بیوتیکی، *سودوموناس آئروژینوزا* به دلیل مقاومت ذاتی به اکثر آنتی بیوتیک‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی شناسایی شده است. در مطالعه آذرگون و همکاران از ۵۱ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس،

www.SID.ir

Archive of SID

۳۷/۲٪ مقاوم به جنتامایسین، ۲۱/۵٪ مقاوم به آمیکاسین، ۱۵/۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین و ۹/۸٪ مقاوم به سفتازیدیم بودند[۱۹]. در مطالعه حاضر میزان حساسیت نسبت به آمیکاسین در بین نمونه‌های بالینی ۸۰/۳٪ بود که در مقایسه با سایر مطالعات به عمل آمده مقاومت کمتری را نشان داد. از طرفی در مطالعات میرصالحیان و همکاران[۲۰] میزان مقاومت به این آنتی بیوتیک بسیار بالا بوده است. به نظر می‌رسد این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در منبع سویه‌ها باشد. میزان مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در مطالعات یزدی و همکاران[۲۱]، شاهچراغی و همکاران[۲۲]، دوستی و همکاران[۲۳] و فاضلی و همکاران[۲۴] به ترتیب ۴۲٪، ۴۱٪ ، ۴۰/۶٪ و ۹۸/۷٪ بود. مقایسه نتایج تحقیق حاضر (۲۱/۷٪ مقاومت) با تحقیق‌های دیگر نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌ها کمتر بوده و هنوز کارآیی لازم را جهت درمان بیماران مبتلا به این باکتری دارا می‌باشد. سفتازیدیم آنتی‌بیوتیک دیگری است که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت و میزان مقاومت ۲۷/۶٪ از خود نشان داد. مقایسه این نتیجه با نتایج سایر مطالعات از جمله فاضلی و همکاران (۱۰۰٪)[۲۴]، شاهچراغی و همکاران (۴۲٪)[۲۲]، دوستی و همکاران (۷۸/۹٪)[۲۳]، خسروی و همکاران (۸۱٪)[۲۵]، موحدی و همکاران (۷۵٪)[۲۶]، اولیا و همکاران (۷۳/۴۴٪)[۲۷]، نشان می‌دهند نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در این تحقیق کمترین میزان مقاومت به سفتازیدیم را نسبت به سایر مطالعات دارند. علت عدم مغایرت مطالعه این محققین با مطالعه پیش رو می‌تواند در نوع نمونه، محل انجام آزمون، بازه زمانی و دیسک‌های مورد استفاده باشد. نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی در برابر ایمی پنم (۶۳/۳٪) در مطالعه میرصالحیان[۲۰] و عزیز ژاپنی[۲۸] همخوانی ندارد درحالیکه با دیگر مطالعات مانند خسروی و همکاران[۲۵]، اولیا و همکاران[۲۷] و سلامی و همکاران[۲۹] همخوانی دارد. علت این عدم همخوانی می‌تواند در نتیجه تفاوت در نمونه‌ها و حجم نمونه‌گیری باشد. در این تحقیق ۱۳/۹٪ و ۲۹/۵٪ از سویه‌ها به ترتیب به ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند. بررسی‌ها نشان می‌دهد، میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنم نیز درچند سال اخیر به دلیل انتشار و انتقال ژن‌های کدکننده متالوبتالاکتاماز درحال افزایش است. در سال ۲۰۰۴ لوزارو و همکاران نشان دادند که ۱۵٪ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمی‌پنم بودند[۳۱]. این تحقیق نتایج مشابهی را با لوزارو نشان داد، اما نسبت به سایر مطالعات مقاومت کمتری را نشان داد، دلیل این امر می‌تواند نوع نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* باشد که از بیماران غیر بستری مرکز درمانی جدا شده‌اند و به همین دلیل مقاومت کمتری را نسبت به ایمی پنم نشان دادند. فرانکو وهمکاران در سال ۲۰۱۰ درتحقیقی که در بیمارستانی در برزیل انجام گرفت مشاهده کردند که ۱۰۰٪ بیماران مقاوم به ایمی‌نم بودند[۳۲]. در این تحقیق میزان مقاومت به آمیکاسین ۹/۹٪ گزارش شد. ماکادو درسال ۲۰۰۰ نشان داد که ۱۵٪ سویه‌ها مقاوم به آمیکاسین بودند[۳۰]. شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که ۹۳/۴٪ از سویه‌ها مقاوم به آمیکاسین بودند[۲۲]. زهرا موحدی و همکاران در تحقیقی که درسال۸۹ بر روی کودکان بخش NICU مرکز طبی کودکان انجام دادند با مقاومت ۱۸٪ در مواجه با آنتی بیوتیک آمیکاسین مواجه شدند[۲۶]. پروتئین *OprL* یکی از لیپوپروتئین‌های تشکیل دهنده پمپ ایفلاکس می‌باشد. حضور این ژن علاوه بر اینکه یک عامل حدت در *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد، نشانگر مناسبی در جهت تشخیص این گونه باکتریایی به شمار می‌رود. اولین بار Devos و همکاران در سال ۱۹۹۷، آزمون PCRژن *oprL* را بر روی ۲۰ گونه متفاوت سودوموناس جدا شده از نمونه‌های بالینی انجام دادند. در این مطالعه فقط گونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در PCR این ژن مثبت بودند و بقیه گونه‌های سودوموناس منفی گزارش شدند. حساسیت و ویژگی این روش در مقایسه با روش کشت، به ترتیب ۱۰۰٪ و ۷۴٪ گزارش شد[۳۳]. اصلانی و همکاران درسال ۱۳۸۸، شناسایی ژنهای اختصاصی جنس و گونه *oprI* و *oprL* را بر روی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از عفونت‌های تنفسی را انجام دادند. ۱۰۰٪نمونه‌ها با روشPCR نسبت به ژن‌های اختصاصی*oprI* مثبت بودند و تشخیص این گونه با استفاده از این پرایمر دارای حساسیت بالایی گزارش شد[۳۴]. در مطالعه حاضر از میان نمونه‌های انسانی ۵۱ ایزوله (۱۰۰٪) ژن *oprI* و ۱۷ ایزوله (۳۳/۳٪) ژن *oprL* و از میان نمونه‌های دامی ۲۴ ایزوله (۴۸٪) دارای ژن *oprL* و ۵۱ ایزوله (۱۰۰٪) دارای ژن *oprI* بودند. نجفی و همکاران در سال۱۳۹۲ به بررسی فراوانی ژنهای *oprL* و *algD* با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای این ژن‌ها پرداختند. از ۷۰ نمونه بالینی مورد

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی، نتایج مثبت PCR به ترتیب برای ژن‌های *exoA* و *oprL* در ۶۸ و ۷۰ نمونه به دست آمد که حساسیت به ترتیب ۹۷/۲٪ و ۱۰۰٪ به دست آمد[۳۵]. در نتایج این مطالعه مشخص شد که فراوانی این دو ژن در بین نمونه‌های انسانی و دامی مشابه است. همچنین نتایج این تحقیق با سایر مطالعات همخوانی دارد. در تانزانیا شم و همکاران در سال ۲۰۰۱ به بررسی ورم پستان‌های تحت بالینی در بین نژادهای مختلف پرداخته و به این نتیجه رسیدند که میزان ابتلا به باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از درصد کمتری نسبت به *استافیلوکوک اورئوس* و *استرپتوکوک آگالاکتیه* برخوردار است و ۲۰ درصد ورم پستان‌ها را ناشی از این باکتری گزارش نمودند[۳۶]. جیانگ و همکاران در بررسی خود سال (۲۰۱۵) بر روی ۲۲۷۵۹ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان‌های تحت بالینی، میزان آلودگی به *سودوموناس آئروژینوزا* را ۶۲/۵۵ درصد گزارش نمودند[۳۷]. در پژوهشی بر روی باکتریهای ایجادکننده ورم پستان دوره خشکی در تبریز به این نتیجه رسیدند که ۱۳/۳۲ درصد نمونه‌ها آلوده به *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشند. کیرک و همکاران برنامه مدونی برای کنترل ورم پستان‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در گله‌های شیری ارائه می‌کنند. او در این برنامه به عوامل ایجاد کننده و راههای کنترل و مهار این عوامل در جهت کاهش ورم پستان ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* می‌پردازد. وی در این برنامه به انجام مرتب و دوره ای کشت نمونه‌های شیر دامهای دارای علائم، کنترل و آزمایشات میکروبی آب دامداری، اجرای برنامه صحیح بهداشتی اشاره می‌نماید[۳۸]. زادوکس و همکاران در سال (۲۰۱۱)، استفاده از محلول کلرهگزیدین را در ضدعفونی سرپستان‌ها در کاهش میزان ابتلا موثر می‌دانند[۳۹]. *سودوموناس آئروژینوزا* از جمله باکتری‌های مقاوم است که به دلیل کاهش نفوذپذیری دارو و تولید آنزیم‌های مختلف، دارای مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. تیله و همکاران در سال (۲۰۰۳)، بررسی بر روی میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی عوامل ایجادکننده ورم پستان در گله گاوهای شیری را انجام داده و میزان مقاومت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از ورم پستان گاوهای مبتلا را که دارای سنین مختلف بودند گزارش نمودند. در نتایج تیله میزان مقاومت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، آموکسی سیلین، تتراسایکلین، انروفلوکساسین، تری‌متوپریم/سولفانامید، سفوپرازون و استرپتومایسین بین سالهای ۲۰۰۳-۱۹۹۹ به ترتیب برابر با ۹۴ درصد، ۹۳ درصد، ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد، ۹۶ درصد اعلام شد[۴۰]. درتحقیق سال ۹۲ دوستی و همکاران ۵۵/۱٪ از بیماران مقاوم به ایمی‌پنم بودند[۲۳]. خوشبختانه در مطالعه ما مشخص گردید که هیچ یک از نمونه‌های دامی نسبت به ایمی‌پنم مقاومت نداشته ولی میزان مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیکهای تتراسایکلین و آمپی‌سیلین با توجه به مصرف زیاد این نوع آنتی‌بیوتیکها رو به افزایش بوده که می‌بایست روند انتخاب شیوه درمان در بین مزارع پرورش گاو تغییر یابد. اگزوتوکسین A سم اصلی تولید شده توسط باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بوده و از عوامل مرگ و میر می‌باشد. این سم به صورت کروموزومی کد شده و از ژن آن فقط یک نسخه وجود دارد که در ۹۰٪ سویه‌ها شناسایی شده است. این سم با غیرفعال ساختن فاکتور ۲ طویل سازی پروتئین موجب توقف سنتز و در نهایت مرگ سلول می‌شود. اگزوتوکسین A دارای ۳ ناحیه می‌باشد: ناحیه ۱ به رسپتورهای سلول میزبان متصل شده و اندوسیتوز را آغاز می‌کند، با اسیدی شدن اندوزوم، ناحیه ۲ حرکت توکسین به سمت سیتوپلاسم را موجب شده و ناحیه ۳ انتقال ADP ریبوز به EF2 را کاتالیز می‌کند[۱۰].

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت شناسایی سریع باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و با توجه به مشکلات موجود در روشهای بیوشیمیایی، روشهای مولکولی مانند PCR روشی حساس و سریع در شناسایی این باکتری می‌باشد. به علاوه شناسایی همزمان چند فاکتور ویرولانس و با روش Multiplex PCR اختصاص بالایی به این کار می‌بخشد. ژنهای *oprL* و *ETA* دارای شیوع بالایی در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشند و نشانگر مناسبی جهت تشخیص این باکتری می‌باشند. اگزوتوکسین A بعلاوه اینکه از عوامل اصلی پاتوژنز باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* است، شیوع بالایی نیز در بین ایزوله‌ها دارد. بنابراین لزوم توجه به سویه‌های جدا شده از بالین و دام که حاوی این ژن هستند وجود دارد تا از اثرات این توکسین بر بافت‌های دامی و انسانی جلوگیری شود. مقاومت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی بیوتیکی در سویه‌های دامی و انسانی شیوع بالایی دارند و لزوم توجه به مصرف مناسب و به اندازه آنتی بیوتیک‌ها احساس می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه با کد ۶۷۸ در دانشکده دامپزشکی تهران بوده و از کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Stover C, Pham X, Erwin A, Mizoguchi S, Warrener P, Hickey M, et al. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000;406(6799):959-64.
2. Choi K-H, Kumar A, Schweizer HP. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent Pseudomonas aeruginosa cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. Journal of microbiological methods 2006;64(3):391-7.
3. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, et al. Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients. Proceedings of the National Academy of Sciences 2006;103(22):8487-92.
4. Perron K, Caille O, Rossier C, van Delden C, Dumas J-L, Köhler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa .Journal of Biological Chemistry 2004;279(10):8761-8.
5. Smith RS, Iglewski BH. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target. Journal of Clinical Investigation 2003;112(10):1460.
6. Jae LT, Raaben M, Riemersma M, van Beusekom E, Blomen VA, Velds A, et al. Deciphering the glycosylome of dystroglycanopathies using haploid screens for lassa virus entry. Science 2013;340(6131):479-83.
7. Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH. Health and economic outcomes of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Archives of Internal Medicine 1999;159(10):1127-32.
8. Arun IS. Studies on Immunogenicity and Protective Efficacy of Different Recombinant Proteins of Pseudomonas aeruginosa. 2015.
9. Köhler T, Buckling A, Van Delden C. Cooperation and virulence of clinical Pseudomonas aeruginosa populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 2009;106(15):6339-44.
10. 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 University of Medical Sciences Journal 2016;10(1):48-55.
11. Sana TG, Baumann C, Merdes A, Soscia C, Rattei T, Hachani A, et al. Internalization of Pseudomonas aeruginosa strain PAO1 into epithelial cells is promoted by interaction of a T6SS effector with the microtubule network. MBio. 2015;6(3):e00712-15.
13. Bannerman DD, Chockalingam A, Paape MJ, Hope JC. The bovine innate immune response during experimentally-induced Pseudomonas aeruginosa mastitis. Veterinary immunology and immunopathology 2005;107(3):201-15.
14. Rella M, Haas D .Resistance of Pseudomonas aeruginosa PAO to nalidixic acid and low levels of beta-lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982;22(2):242-9.
15. Miller WL, Matewish MJ, McNally DJ, Ishiyama N, Anderson EM, Brewer D, et al. Flagellin glycosylation in Pseudomonas aeruginosa PAK requires the O-antigen biosynthesis enzyme WbpO. Journal of Biological Chemistry 2008;283(6):3507-18.
16. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Applied and environmental microbiology 1994;60(10):3739-45.
17. Salman M, Ali A, Haque A. A novel multiplex PCR for detection of Pseudomonas aeruginosa: A major cause of wound infections. Pakistan journal of medical sciences 2013;29(4):957.
18. Gawish AA, Mohamed NA, El-Shennawy GA, Mohamed HA. An investigation of type 3 secretion toxins encoding-genes of Pseudomonas aeruginosa isolates in a University Hospital in Egypt. Journal of Microbiology and Infectious Diseases 2013;3(03).
19. Azargoon R, Doustdar F, Khanbabaei 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.
20. Mirsalehian A, Bahador A, Bigverdi R, Goli H. Prevalence of MBL-producing Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Tehran University of Medical Sciences 2011;68(10).
21. Yazdi HR, Nejad GB, Peerayeh SN, Mostafaei M.

www.SID.ir

Archive of SID

Prevalence and detection of metallo-β-lactamase (MBL)-producingPseudomonas aeruginosa strains from clinical isolates in Iran. Annals of microbiology 2007;57(2):293.

22. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization of metallo-beta-lactamase-producing strains of Pseudomonas aeruginosa in Tehran, Iran. New Microbiologica. 2010;33(3):243-8.

23. Doosti M, Ramazani A, Garshasbi M. Identification and characterization of metallo-β-lactamases producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in University Hospital from Zanjan Province, Iran. Iranian biomedical journal 2013;17(3):129.

24. Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in Pseudomonas aeruginosastrains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). Iranian Journal of Medical Microbiology 2010;3(4)1-8.

25. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-β-lactamase–producing Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. Diagnostic microbiology and infectious disease 2008;60(1):125-8.

26. Movahedi Z, Pourakbari B, Mahmoudi S, Sabouni F, ASHTIAnI MH, Sadeghi RH, et al. Pseudomonas aeruginosa infection among cystic fibrosis and ICU patients in the referral children medical hospital in Tehran, Iran. Journal of preventive medicine and hygiene 2013;54(1):24.

27. Owlia P, Saderi H, Karimi Z, Rad A, Bagher SM, Bahar MA. Phenotypic detection of Metallo-beta-Lactamase producing Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burned patients. Iranian Journal of Pathology 2008;3(1):20-5.

28. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in the South of Iran. Burns 2006;32(3):343-7.

29. Salami H. owlia P, Yakhchali B, Rastegar lari A. Drug susceptibility and molecular epidemiology of pseudomonas aeruginosa isolated in a burn unit. J infect Dis. 2009;5(4):308-13.

30. 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. Journal of Hospital Infection 2005;60(3):245-8.

31. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier J-D, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, et al. Prevalence and characterization of metallo-β-lactamases in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Diagnostic microbiology and infectious disease 2004;48(2):131-5.

32. Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in a Brazilian university hospital. Clinics 2010;65(9):825-9.

33. Devos D, Garmendia J, Lorenzo Vd, Valencia A. Deciphering the action of aromatic effectors on the prokaryotic enhancer-binding protein XylR: a structural model of its N-terminal domain. Environmental microbiology 2002;4(1):29-41.

34. Aslani M, Hashemipour M, NikBin V, Shahcheraghi F, Eydi A, Sharafi Z. PCR identification of Pseudomonas aeruginosa based on two outermembrane lipoprotein oprI, oprL, and exotoxin A gene. J Med Sci Lorestan. 2009;11(2):21-6.

35. Rafatbakhsh-Iran S, Salehzadeh A, Yousefimashouf R, Najafimosleh M, Karimitabar Z, Khedri M. Bacteria of Phlebotominae Sand Flies Collected in Western Iran. Iranian Journal of Health, Safety and Environment 2015;2(3):313-9.

36. Shem M, Malole J, Machangu R, Kurwijila L, Fujihara T. Incidence and causes of sub-clinical mastitis in dairy cows on smallholder and large scale farms in tropical areas of Tanzania. Asian Australasian Journal of Animal Sciences 2001;14(3):372-7.

37. Zhong H, Jiang Y, Zeng G, Liu Z, Liu L, Liu Y, et al. Effect of low-concentration rhamnolipid on adsorption of Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 on hydrophilic and hydrophobic surfaces. Journal of hazardous materials 2015;285:383-8.

38. Kirk J, Mellenberger R. Pseudomonas-infected dairy cows. Extension bulletin E-Cooperative Extension Service. 1987.

39. Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. Journal of mammary gland biology and neoplasia 2011;16(4):357-72.

40. Teale C, Martin P, Watkins G. VLA antimicrobial sensitivity report. UK: Crown. 2002.

63. Doosti A, Pourabbas M, Arshi A, Chehelgerdi M, Kabiri H. TEM and SHV genes in Klebsiella pneumoniae isolated from cockroaches and their antimicrobial resistance pattern. Osong public health and research perspectives 2015;6(1):3-8.

www.SID.ir

Archive of SID

AUMJ Alborz University of Medical Sciences Journal

Alborz University of Medical Sciences Journal, January 2021, Vol. 10, No. 1: 89-104 *Original Article*

Alireza Mokhtari[1*], Taghi Zahraee Salehi[2], Ehsan Estabraghi[3]

[1] *Technical Assistant of the Department of Microbiology, Atiyeh Veterinary Laboratory, Tamin Atiyeh Salamat Alborz Knowledge Foundation Company, Alborz, Iran*

[2] *Professor of Microbiology Department, Faculty of Vetrinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

[3] *Assistant Professor, Department of Veterinary, shahre babak Branch, Islamic Azad University, shahre babak, Iran*

Frequency of Exotoxin A, Exoenzyme, Alginate and PprI and PprL Virulence Genes in Animal and Human Pseudomonas Aeruginosa Isolates and Determination of Antibiotic Resistance Pattern

Received: 31 Dec. 2019; Accepted:10 May 2020

Abstract

Background and Aims: *Pseudomonas aeruginosa* is the most important cause of various nosocomial infections and mastitis in dairy cattle and the development of antibiotic resistance. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and the presence of virulence genes in human and animal samples.

Materials and Methods: In this study, 102 human and animal strains of *Pseudomonas aeruginosa* were studied. Multiplex PCR for virulence factors was used to detect specific genes. Disk diffusion and E-test were performed according to CLSI method with different antibiotics.

Results: The results of antibiogram of human isolates of *Pseudomonas aeruginosa* showed the highest resistance to ampicillin and cefepime antibiotics (100%), and the highest resistance in animal isolates to ampicillin (100%). The prevalence of oprI gene was detected in 100% of human isolates and all samples were negative for alg-D gene. Unlike human samples, all animal samples were negative for exoenzyme S and only exoenzyme Y was detected in 15 isolates (25%). Exoenzyme T was the most abundant in human isolates. 100% of the samples were positive for this exoenzyme.

Conclusion: High prevalence of virulence genes between human and animal isolates and attention to the function of these genes makes it necessary to identify the effect on animal and human tissues. Due to the high level of antibiotic resistance in animal and human strains, proper use and size of antibiotics should be observed.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Multiplex-PCR, Antibiotic resistance, Alginate, Exotoxin

***Corresponding Author:**
Technical Assistant of the Department of Microbiology, Atiyeh Veterinary Laboratory, Tamin Atiyeh Salamat Alborz Knowledge Foundation Company, Alborz, Iran

Tel: 09196977522
E-mail: Alm3370@gmail.com

www.SID.ir