Original Article

# Detection of Tox A Gene in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Dairy Products Using PCR and Determining the Antibiotic Resistance Pattern

*Faeze Zadsafar[1], Mohsen Zargar[1*], Seyyed Soheil Aghaei[1]*

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
**Mohsen Zargar**,
Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Email:
zmohsen2002@yahoo.com

Received: 26 May, 2016

Accepted: 17 Jul, 2016

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

***Abstract***

***Background and Objectives*:** Due to the high nutritional value of milk, it has an important role in human nutrition, and on the other hand, it is a suitable medium for the growth of bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa*, is an opportunistic pathogen highly resistant to antibiotics and can cause disease in immunodeficient patients. The purpose of this study was isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from raw milk, detection of *tox A* gene by PCR, and determining antibiotic resistance, multiple resistance of the isolates, and Identification of ESBL isolates.

***Methods:*** In this cross-sectional study, a total of 360 samples (300 samples of raw milk, 30 samples pasteurized milk, and 30 samples of cream), were collected from animal husbandries and stores in Qom city. Initially, the isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, were confirmed by standard microbiological methods, and then the existence of exotoxin A gene in all isolates was detected by PCR method and the antibiotic resistance of the isolates against 10 antibiotics selected from different antibiotic categories, was investigated according to the CLSI standard. The data were analyzed using t-test.

***Results:*** Out of 360 studied samples, 117 *Pseudomonas aeruginosa* were isolated, among which 101 strains (86.30%) had tox A gene. In antibiotic resistance testing, the highest resistance was seen against ceftazidime, and it was revealed that there is a significant relationship between the presence of *tox A* gene and antibiotic resistance in the isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

***Conclusion:*** Due to high presence of *Pseudomonas aeruginosa* in raw milk and existence of antibiotic resistance genes in this bacterium, applying appropriate strategies for hygiene control in animal husbandries, is necessary to prevent the spread of bacteria.

***Keywords:*** *Pseudomonas aeruginosa*; Drug Resistance, Microbial; dairy products; polymerase chain reaction; gene *tox A*.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره ششم، شهریور ۹۶
صفحه ۷۲ الی ۸۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

# ردیابی ژن *toxA* در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از محصولات لبنی، با روش PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

فائزه زادصفر[۱]، محسن زرگر[۱]*، سیدسهیل آقائی[۱]

[۱]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

## چکیده

**زمینه و هدف:** شیر به‌علت ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان نقش به‌سزایی دارد و از طرفی، محیط مناسبی برای رشد باکتری‌هایی چون *سودوموناس آئروژینوزا* است. *سودوموناس آئروژینوزا*، پاتوژن فرصت‌طلبی است که مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها داشته و می‌تواند در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، ایجاد بیماری کند. این تحقیق با هدف جداسازی *سودوموناس آئروژینوزا* از شیرخام، ردیابی ژن *toxA* در جدایه‌ها با روش PCR و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت چندگانه جدایه‌ها و تشخیص ایزوله‌های ESBL انجام گرفت.

**روش بررسی:** در این مطالعه مقطعی، تعداد ۳۶۰ نمونه (۳۰۰ نمونه شیرخام، ۳۰ نمونه شیر پاستوریزه و ۳۰ نمونه خامه) از دامداری‌ها و فروشگاه‌های شهر قم جمع‌آوری شد. ابتدا با روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی، جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تأیید شدند، سپس حضور ژن اگزوتوکسین A با روش PCR در تمامی جدایه‌ها، و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در مقابل ۱۰ آنتی‌بیوتیک منتخب از رده‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی طبق استاندارد CLSI بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون تست تی تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** از ۳۶۰ نمونه مورد بررسی، ۱۱۷ *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شد که از این تعداد، ۱۰۱ سویه (۸۶/۳۰٪) دارای ژن *toxA* بود. در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم به دست آمد و مشخص گردید بین حضور ژن *toxA* و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، ارتباط معنی‌داری وجود دارد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به شیوع بالای *سودوموناس آئروژینوزا* در شیرخام و وجود ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری، اعمال راهکارهای مناسب جهت کنترل بهداشت در دامداری‌ها، برای جلوگیری از انتشار باکتری ضروری است.

**کلید واژه‌ها:** *سودوموناس آئروژینوزا*؛ مقاومت دارویی میکروبی؛ محصولات لبنی؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز؛ ژن توکس‌آ.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
**محسن زرگر**، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
zmohsen2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۶

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

**Zadsafar F, Zargar M, Aghaei SS. Detection of Tox a gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dairy products using PCR and determining the antibiotic resistance patter. Qom Univ Med Sci J 2017;11(6):72-81. [Full Text in Persian]**

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

## مقدمه

*سودوموناس آئروژینوزا* یک باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیرتخمیری متحرک با تک تاژه قطبی با نیازهای غذایی حداقل است (۱). عوامل ویرولانس متنوعی چون توکسین‌ها، آنزیم‌ها، فلاژل، پیلی، آلژینات، LPS و پروتئازها در چسبیدن این باکتری به سلول‌های میزبان و بیماری‌زایی آن نقش دارند. دوام و ماندگاری این باکتری با توانایی تشکیل بیوفیلم مرتبط است. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در سالهای اخیر موجب شده که این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از گروه‌های مختلف مقاوم شود، به‌طوری‌که در حال حاضر وجود سویه‌های با مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکل اصلی در مبارزه با این باکتری است. کاهش نفوذپذیری غشای خارجی، تولید بتالاکتاماز کروموزومی و تغییر در سیستم‌های تراوشی از عوامل اصلی مقاومت ذاتی باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شود (۳،۲). یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا*، اگزوتوکسین A می‌باشد. اگزوتوکسین A، یک محصول خارج سلولی است که تقریباً در ۹۰٪ *سودوموناس آئروژینوزاها* تولید می‌شود. اگزوتوکسین A به‌وسیله سیستم ترشحی نوع II در فاز رکود و در محدودیت آهن به فضای خارج سلولی ترشح می‌شود (۴). این توکسین یک ADP - ریبوزیل ترانسفراز است که از عمل فاکتور طویل‌کننده -۲ (EF-2) ممانعت کرده و پروتئین‌سازی را در سلول سرکوب می‌کند که در نتیجه منجر به مرگ سلول می‌شود (۵). جهش در ژن *toxA* منجر به کاهش مهم و جدی پاتوژنیسیتی در میزبان می‌شود. همچنین این توکسین باعث کاهش فشارخون، شوک، نکروز کبدی و لکوپنی می‌گردد. افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را نیز می‌توان ناشی از تولید اگزوتوکسین A در فاز رکود دانست (۷،۶)، در اثر عمل پمپ‌های افلاکس که آنتی‌بیوتیک‌ها را از سلول باکتری بیرون می‌کند، اگزوتوکسین A نیز از سلول خارج می‌شود. این توکسین با تغییر هدف آنتی‌بیوتیک‌ها، از تأثیر آنها بر سلول باکتری جلوگیری می‌کند. از مهم‌ترین مکانیسم اگزوتوکسین A، تنظیم ژن‌های مقاومت و تنظیم برنامه‌ریزی مجدد مسیرهای بیوسنتتیک در باکتری است که باعث مقاوم شدن سلول باکتری در برابر عوامل ضدمیکروبی شده و بقای باکتری تثبیت می‌گردد (۸).

سودوموناس، یکی از عوامل فساد مواد غذایی مثل لبنیات، گوشت و تخم‌مرغ می‌باشد؛ زیرا توانایی رشد در دمای یخچال را دارد، همچنین دارای سرعت رشد و تکثیر بالایی است که باعث ایجاد چسبندگی در سطح مواد غذایی می‌شود. آنزیم‌های باکتری *سودوموناس* ممکن است در طول ذخیره‌سازی سرد شیرخام، تولید شود و پس از آن در سه جزء اصلی شیر؛ یعنی پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها اثر کند (۹). *سودوموناس با* تولید لیپاز و پروتئاز مقاوم به حرارت باعث تلخی، ترشیدگی و تجزیه کازئین همراه با تولید محصولات لزج و انعقاد پروتئین می‌شود (۱۱،۱۰). بسیاری از آنزیم‌های این باکتری می‌توانند کیفیت و قدرت ماندگاری محصولات لبنی فرآوری‌شده را کاهش دهند. برخی از آنزیم‌ها قادر به مختل کردن غشای مولکول چربی شیر می‌باشند. این باکتری به‌عنوان یک مشکل تکرارشونده؛ در نگهداری شیر در یخچال، توزیع محصولات لبنی و مواد فاسدشدنی شناخته شده است (۱۲). از طرفی، تبدیل شدن آن به میکروفلور غالب در هنگام ذخیره‌سازی شیر در سرما و آنزیم‌های خارج سلولی آن، باعث فساد محصولات لبنی می‌شود (۱۳،۱۱). وجود این باکتری و محصولات آن در شیر ممکن است شاخص از آلودگی مدفوعی نیز در نظر گرفته شود. پروتئولیز، عامل اصلی کاهش زمان نگهداری شیر است و به دلیل تغییرات در عطر، طعم و بافت؛ شکل نهایی آن به‌صورت یک ژل بوده که این فرآیند از اهمیت ویژه اقتصادی برخوردار است (۱۰). در راستای این پژوهش، تحقیقاتی صورت گرفته است. Akoglu (سال ۲۰۱۲) در مطالعه خود بر روی ۱۴ نمونه شیرخام جمع‌آوری‌شده از فروشگاه‌ها در ترکیه، ۹ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (۶۴/۲٪)، جداسازی کرد (۱۴). این تحقیق با هدف جداسازی *سودوموناس آئروژینوزا* از شیرخام و ردیابی ژن *toxA* در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، همچنین بررسی مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها (MDR) و تعیین ایزوله‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (Extended Spectrum Beta-lactamase, ESBL) انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه مقطعی، جمع‌آوری نمونه‌ها از فروردین‌ماه تا

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

مردادماه سال ۱۳۹۴ به‌صورت تصادفی و از فروشگاه‌های مختلف سطح شهر و دامداری‌ها انجام گرفت (۱۰۰ نمونه شیرخام از دامداری‌ها و مستقیماً از دام گرفته شد و ۲۰۰ نمونه از مغازه‌های سطح شهر، ۳۰ نمونه شیر پاستوریزه از کارخانه‌ها و ۳۰ نمونه خامه محلی از فروشگاه‌های سطح شهر جمع‌آوری شد.) تمامی نمونه‌ها در شرایط استریل، داخل لوله‌های استریل درپوش‌دار و در کابین حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. از هر نمونه شیر، یک سی‌سی به محیط ستریمید آگار، منتقل و کشت انبوه داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس برای بررسی میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی گرم بر روی کلنی‌های رشدیافته انجام شد. برای تأیید باکتری، تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی شامل: آزمون اکسیداز، الگوی تخمیر TSI (تریپل‌شوگرآیرون‌آگار)، تولید رنگدانه پیوسیانین و توانایی رشد در ۴۲ درجه سانتیگراد انجام شد، سپس کشت خالص از جدایه‌ها تهیه گردید (۱۶،۱۵). برای انجام آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن نیز تعداد ۱یا ۲ کلنی از کشت خالص ۲۴ ساعته به لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط تریپتیک سوی براث (مرک آلمان)، منتقل و به مدت ۴-۳ 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 ۰/۵مک‌فارلند به دست آید. برای انجام این کار، سوآب پنبه‌ای استریل به سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، آغشته، سپس سوآب مرطوب روی سطح پلیت ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به ضخامت ۵ -۴میلی‌متر، ۳ بار با زاویه ۳۰ درجه به‌صورت خطوط رفت و برگشت نزدیک به‌هم کشت داده شد تا بدین ترتیب درکل سطح محیط مولر هینتون آگار، به‌صورت یکنواخت کشت داده شود. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت، عمل دیسک‌گذاری انجام شد (۱۷). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (ساخت شرکت MAST انگلیس) مورد استفاده شامل: ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، پلی‌میکسین B (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، آزترئونام (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) بود. دیسک‌ها با پنس استریل به فاصله ۲۵ میلی‌متر از هم و ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار گذاشته شده و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. نتایج با ثبت قطر هاله عدم رشد و مقایسه با استانداردهای CLSI به دست آمد (۱۸). برای تعیین ایزوله‌های ESBL، جدایه‌های مقاوم به سفتازیدیم براساس روش دیسک ترکیبی از نظر حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش از دیسک‌های مرکب (۳۰ میکروگرم سفتازیدیم + ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید و ۳۰ میکروگرم سفوتاکسیم + ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید) تهیه‌شده از شرکت Mast انگستان استفاده گردید. دیسک‌ها در فاصله ۲۰ میلی‌متر از هم در سطح محیط مولر هینتون آگار قرار گرفتند. (درصورتی‌که قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید، ۵ میلی‌متر یا بیشتر از دیسک سفتازیدیم باشد، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، مثبت در نظر گرفته می‌شود.) برای تعیین مقاومت چندگانه (MDR)، سویه‌های مقاوم به حداقل سه کلاس آنتی‌بیوتیکی، شمارش و به‌عنوان سویه‌های MDR در نظر گرفته شدند (۲). برای استخراج DNA جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، از روش جوشاندن استفاده گردید. چندین کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری در میکروتیوپ حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، تلقیح و کمی ورتکس شد تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید. میکروتیوپ‌ها در بن‌ماری جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند، سپس میکروتیوپ‌ها در ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. مایع رویی، جدا و در میکروتیوپ استریل وارد گردید. به‌منظور بررسی DNA ژنومیک استخراج‌شده، نمونه حاصل بر روی ژل آگارز ۱٪، الکتروفورز شد (۲۰،۱۹). پرایمرها توسط شرکت تکاپو زیست سنتز شدند. اندازه قطعه مورد نظر ۶۹۰bp می‌باشد.

F: 5 –GACCTCAAGGACGGCGTGCG -3
R: 5 –GCGATGACTGATGACCGTGGGC -3

واکنش PCR در حجم استاندارد ۲۰ مول برلیتر انجام گرفت. هر واکنش PCR شامل: 0/2mM dNTP، 0/2pmol از هر پرایمر، 1/5mM $MgCl_2$، 2U/µlآنزیم Taq و DNA 20ng الگو می‌باشد.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

تکثیر با استفاده از برنامه مشخص برای ۳۵ سیکل در دمای دناتوراسیون اولیه ۹۳ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳ دقیقه، سپس دمای ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای اتصال ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به‌مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. بعد از این ۳۵ سیکل، تکثیر نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت. برای کنترل مثبت واکنش PCR، از DNA استخراج‌شده از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 واجد ژن *toxA* و جهت کنترل منفی از آب مقطر استفاده شد. محصول PCR ازنظر حضور ژن مورد نظر، با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪، بررسی گردید (۲۱). داده‌ها با استفاده آزمون تست تی و نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

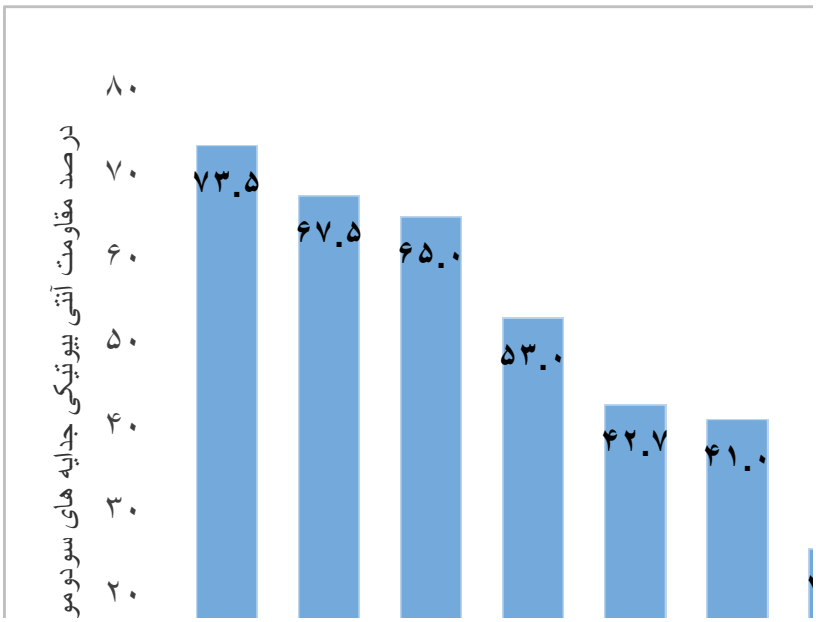
## یافته‌ها

در مجموع، ۱۱۷ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* پس از انجام آزمون‌های استاندارد آزمایشگاهی، جداسازی شد. از ۱۰۰ نمونه شیری که از دام گرفته شد، ۱۵ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۵٪) و از ۲۰۰ نمونه جمع‌آوری‌شده از مغازه‌ها، ۹۹ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جدا گردید (۴۹/۵٪). از ۳۰ نمونه شیر پاستوریزه، یک سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (۳/۳٪) و از ۳۰ نمونه خامه محلی، ۲ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (۶/۶٪) جدا شد (جدول شماره ۱).

**جدول شماره ۱: فراوانی *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده و حضور ژن *toxA* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی**

| نوع نمونه / فراوانی | شیرخام | شیر پاستوریزه | خامه محلی | جمع |
|---|---|---|---|---|
| **تعداد نمونه‌های جمع‌آوری‌شده** | ۳۰۰ | ۳۰ | ۳۰ | ۳۶۰ |
| **تعداد جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*** | ۱۱۴ | ۱ | ۲ | ۱۱۷ |
| **تعداد جدایه‌های واجد ژن *toxA*** | ۱۰۱ | ۰ | ۰ | ۱۰۱ |
| **مقاومت دارویی چندگانه جدایه‌ها** | ۲۵ | ۱ | ۱ | ۲۷ |
| **جدایه‌های تولیدکننده *ESBL*** | ۲۷ | ۰ | ۱ | ۲۸ |

با انجام تست آنتی‌بیوگرام، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (۷۳/۵٪) و بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین و پلی‌میکسین B (۱۰۰٪) در بین جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به دست آمد (نمودار).




**نمودار: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*.**

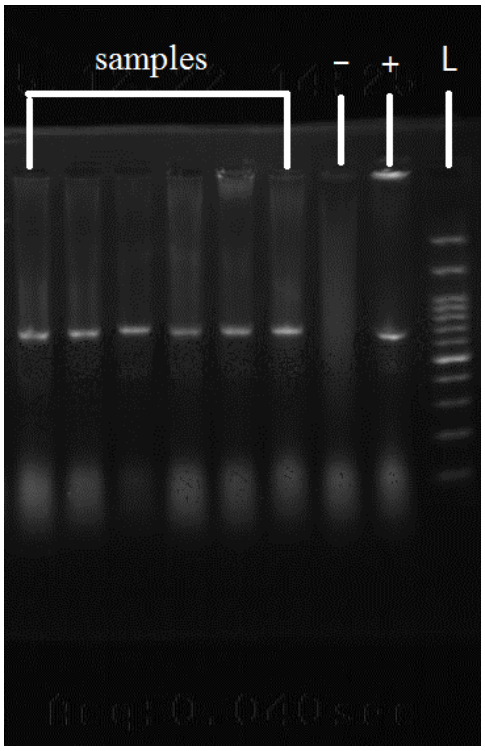
**(CAZ: سفتازیدیم، CRO: سفتریاکسون، CTX: سفوتاکسیم، ATM: آزترئونام، CPM: سفپیم، IMI: ایمی‌پنم، CIP: سیپروفلوکساسین، GEM: جنتامایسین، PB: پلی‌میکسین B؛ AMK: آمیکاسین)**

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

از ۱۱۷ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا*، ۲۷ جدایه (۲۳٪)؛ مقاومت دارویی چندگانه (MDR) به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی نشان دادند. این مقاومت‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آزترئونام (از کلاس مونوباکتام‌ها)، ایمی‌پنم (از کلاس کرباپنم‌ها)، سفتازیدیم و سفوتاکسیم (از کلاس سفالوسپورین‌ها) بود (جدول شماره ۱). از ۱۱۷ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا*، ۸۶ جدایه به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند (۷۳/۵٪) که ۲۸ جدایه از این تعداد، ESBL مثبت داشتند (۳۲/۵۵٪) (شکل شماره ۱).

**شکل شماره ۱: تأیید فنوتیپی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف.**
**۱) دیسک سفتازیدیم، ۲) دیسک ترکیبی سفتازیدیم و کلاولانیک اسید، ۳) دیسک سفوتاکسیم، ٤) دیسک ترکیبی سفوتاکسیم و کلاولانیک اسید.**

با انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، مشخص گردید ۸۶/۳۰٪ از جدایه‌ها، واجد ژن *toxA* بوده‌اند. در شکل شماره ۲، باند در ۶۹۰bp مشخص است.




**شکل شماره ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن *toxA*: ۱۰۰bp Marker.**
**از سمت راست: ستون ۱ مارکر؛ ستون کنترل مثبت سویه *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 و ستون ۳؛ آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی، ستون ٤، ٥ و ٦؛ سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از شیرخام می‌باشند.**

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

با بررسی ارتباط بین حضور ژن *toxA* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مشخص گردید ۸۰/۹۵٪ از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم، واجد ژن *toxA* هستند. همچنین ۸۷٪ از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون، ژن *toxA* داشتند. ۸۵/۷۱٪ از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم حاوی ژن *toxA* بودند. ۹۱/۶۶٪ از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آزترئونام، ژن *toxA* داشتند. ۸۶٪ از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفپیم، واجد ژن *toxA* بودند. ۸۷/۷۸٪ از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم، ژن *toxA* داشتند. ۸۶/۶۶٪ از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین، حاوی ژن *toxA* بودند. ۱۰۰٪ از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، ژن *toxA* داشتند (جدول شماره ۲). براساس نتایج آزمون آماری تست تی، ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن *toxA* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده گردید. مقادیر pvlaue به‌طور متوسط حدود ۰/۱۴ به دست آمد.

**جدول شماره ۲: ارتباط بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و حضور ژن *toxA* در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا***

| آنتی‌بیوتیک | درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های واجد ژن *toxA* |
|---|---|
| **سفتازیدیم** | ٪۸۰/۹۵ |
| **سفتریاکسون** | ٪۸۷ |
| **سفوتاکسیم** | ٪۸۵/۷۱ |
| **آزترئونام** | ٪۹۱/۶۶ |
| **سفپیم** | ٪۸۶ |
| **ایمیپنم** | ٪۸۷/۷۸ |
| **سیپروفلوکسازین** | ٪۸۶/۶۶ |
| **جنتامایسین** | ٪۱۰۰ |

## بحث

*سودوموناس آئروژینوز*، باکتری فرصت‌طلبی است که متابولیسم قوی دارد و یکی از عوامل مهم ایجادکننده عفونت در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف می‌باشد (۲۲). آلودگی محصولات لبنی با *سودوموناس آئروژینوزا*، یکی از مشکلات اساسی در صنایع لبنی است؛ زیرا این باکتری با داشتن عوامل بیماری‌زای متعدد، رشد در دماهای مختلف و مقاوم بودن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها متداول، مشکلات متعددی را ایجاد کرده است (۲۳). در این تحقیق، از ۳۰۰ نمونه شیرخام جمع‌آوری‌شده، ۱۱۴ (۳۸٪) سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شد و از ۳۰ نمونه شیر پاستوریزه، ۱ سویه (۳/۳٪) و از ۳۰ نمونه خامه، ۲ سویه (۶/۶٪) جدا گردید. در تحقیقاتی‌که توسط Prakash در هند (سال ۲۰۰۷) انجام شد، از ۷۵ نمونه شیرخام جمع‌آوری‌شده، ۷ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (۹/۳٪) جداسازی شد (۲۴). در مطالعه‌ای توسط Akoglu در ترکیه (سال ۲۰۱۲) بر روی ۱۴ نمونه شیرخام جمع‌آوری‌شده از فروشگاه‌ها، ۹ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (۶۴/۲٪) جداسازی شد (۱۴). Samet-Bali در تونس (سال ۲۰۱۳)، با بررسی ۳۰ نمونه شیر پاستوریزه، ۶ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (۲۰٪) جداسازی کرد (۲۵). در پژوهش حاضر، در مجموع ۱۱۷ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* از شیرخام، شیر پاستوریزه و خامه جمع‌آوری شد که از این تعداد، ۱۰۱ جدایه واجد ژن *toxA* بود که حساسیت ژن *toxA*، ۸۶/۳۰٪ به دست آمد. در تحقیقاتی‌که توسط Younis در مصر (سال ۲۰۱۵) انجام شد از ۱۰۰ نمونه شیرخام جمع‌آوری‌شده از گاوداری‌ها، ۲۵ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شد (۲۵٪) و با انجام PCR، ۳۳/۳۳٪ جدایه‌ها از لحاظ حضور ژن *toxA*، مثبت گزارش شدند (۲۶). در تحقیق حاضر، بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم بود که ۷۳/۵٪ به دست آمد و ۸۰/۹۵٪ از جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم، واجد ژن *toxA* بودند، همچنین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین به ترتیب ۶۷/۵٪، ۲۵/۶٪ و ۱۴/۵٪ به دست آمد. در مطالعه‌ای که توسط EL-Roos در مصر (سال ۲۰۱۳) انجام گرفت از ۱۰۰ نمونه شیرخام، ۴۰ سویه (۴۰٪) و از ۱۰۰ نمونه

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

شیر پاستوریزه، ۱۶ سویه (۱۶٪) *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شد و بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۶۰/۷٪) بود و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و سفتریاکسون به ترتیب ۲۱/۴٪ و ۱۷/۹٪ به دست آمد (۲۳). در تحقیقی که توسط Arslan در ترکیه (سال ۲۰۱۱) انجام گرفت از ۱۴۰ نمونه پنیر خانگی تهیه‌شده از شیرخام، ۳۲ نمونه به باکتری *سودوموناس* آلوده بودند که ۲ مورد از آنها *سودوموناس آئروژینوزا* بود و با انجام تست آنتی‌بیوگرام، حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین، پلی‌میکسین و جنتامایسین؛ ۱۰۰٪ گزارش شد (۹).

در پژوهش حاضر، ۲۳٪ از جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاومت MDR از خود نشان دادند. Munsch-Alatossava در فنلاند (سال ۲۰۰۷) نیز با بررسی روی ۶۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های شیرخام، گزارش کرد ۵۲/۹٪ از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و ۱۹/۲٪ از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین مقاومت نشان داده‌اند که در مجموع، ۶۰٪ از جدایه‌ها مقاومت MDR داشتند (۲۷). Sivaraj در هند (سال ۲۰۱۲)، از ۵۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های محیطی، گزارش کرد ۴۲٪ مقاومت MDR از خود نشان داده‌اند (۲۸). در پژوهش حاضر از ۱۱۷ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا*، ۳۸ جدایه از لحاظ تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) مثبت بودند (۳۲/۵۵٪)، Stefani در ایتالیا (سال ۲۰۱۴) با بررسی ۱۱ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد ۳۶٪ از جدایه‌ها، مولد ESBL هستند (۲۹). در پژوهشی توسط Nasreen در بنگلادش (سال ۲۰۱۵) از ۵۲ نمونه آب رودخانه مورد بررسی؛ ۳۲ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شد که با انجام تست آنتی‌بیوگرام، تمام این جدایه‌ها به سفتازیدیم و سفوتاکسیم، مقاوم و ۱۰۰٪ مولد ESBL بودند (۳۰).

## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* در شیرخام بالا است که این مطلب زنگ خطری جدی برای جلوگیری از انتشار بیشتر این میکروب می‌باشد. با توجه به فراوانی *سودوموناس آئروژینوزا* در مواد لبنی، به‌خصوص شیر، باید توجه ویژه‌ای به بهداشت و کیفیت مواد لبنی شود. از آنجا که شیر و مواد لبنی به‌علت دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان نقش به‌سزایی دارند و از طرفی محیط غذایی مناسبی برای رشد باکتری‌هایی چون *سودوموناس آئروژینوزا* هستند، لذا دامداری‌ها و فروشگاه‌ها باید از وضعیت کاملاً بهداشتی برخوردار باشند. شیر باید با رعایت موازین بهداشت همگانی تولید شود و در تمام مراحل تولید، جمع‌آوری و حمل و نقل از تماس مستقیم و غیرمستقیم با منبع آلودگی خارجی، دور نگه داشته شود. بنابراین، درصورت عدم رعایت استاندارد در پاکیزگی و بهداشت، عدم کاربرد مواد ضدعفونی‌کننده و فقدان سیستم‌های سردکننده؛ تعداد باکتری‌های موجود در شیر، به بیش از چندین میلیون در هر میلی‌لیتر خواهد رسید.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استاد محترم جناب آقای دکتر نادر حقیقی که در انجام این تحقیق با اینجانب همکاری و مساعدت داشتند، سپاسگزاری می‌کنم.

## References:

1. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs 2007;67(3):351-68.

2. Munsch-Alatossava P, Rita H, Alatossava T. A faster and more economical alternative to the standard plate count (SPC) method for microbiological analyses of raw milks. Commun Curr Res Educ Top Trends Appl Microbiol 2007;495-9.

3. Kelch W, Lee J. Antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria isolated from environmental sources. Appl Environ Microbiol 1978;36(3):450-6.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018

4. Strateva T, Markova B, Ivanova D, Mitov I. Distribution of the type III effector proteins-encoding genes among nosocomial Pseudomonas aeruginosa isolates from Bulgaria. Ann Microbiol 2010;60(3):503-9.

5. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes H. Integrons: Mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends microbiol 2007;15(7):301-9.

6. Bouffartigues E, Gicquel G, Bazire A, Fito-Boncompte L, Taupin L, Maillot O, et al. The major outer membrane protein OprF is required for rhamnolipid production in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol Parasitol 2011;2(118):2.

7. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(10):7072-7.

8. 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. [Full Text in Persian]

9. Arslan S, Eyi A, Özdemir F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of Pseudomonas spp. isolated from cheeses. J Dairy Sci 2011;94(12):5851-6.

10. Hantsis-Zacharov E, Halpern M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. J Appl Environ Microbiol 2007;73(22):7162-8.

11. Skean JD, Overcast WW. Changes in the paper electrophoretic protein patterns of refrigerated skim milk accompanying growth of three Pseudomonas species. Appl Microbiol 1960;8(6):335-8.

12. Singh P, Wani AA, Karim A, Langowski HC. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: A review. Int J Dairy Technol 2012;65(2):161-77.

13. Ogier J, Lafarge V, Girard V, Rault A, Maladen V, Gruss A, et al. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 2004;70(9):5628-43.

14. Akoglu A, Altuntas EG, Yemis GP. A modified selective medium containing benzalkonium chloride (BKC) for the isolation of Pseudomonas aeruginosa from raw milk. Sci Res 2012;3(7):947-50.

15. Peymani A, Farivar TN, Rahimi H, Ranjbar M, Najafipour R. Frequency of class i integron among multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from the selected hospitals in Qazvin and Tehran, Iran. Qom Univ Med Sci J 2014;8(3):61-9. [Full Text in Persian]

16. Hall G. Nonfermenting and miscellaneous Gram negative bacilli. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. Ohio: Saunders-Elsevier Pub; 2007. p. 564-84.

17. Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M, Group PS. Antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa: results of a UK survey and evaluation of the british society for antimicrobial chemotherapy disc susceptibility test. J Antimicrob Chemother 2001;47(6):789-99.

18. Aghaei SS, Javadi A, Morovvati A, Sharifi Y. Detection of exotoxin (A, Y, T, U, S) genes of pseudomonas aeruginosa with multiplex PCR. Qom Univ Med Sci J 2014;43(2):228. [Full Text in Persian]

19. 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.

20. Bayat E, Kamali M, Zare'ei Mahmoodabadi A, Mortazavi Y, Habibi E, Amini B, et al. Isolation, determination and cloning of translocation domain of exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. Trauma Mon 2010;15(3):149-54.

21. Wang L, Jayarao BM. Phenotypic and genotypic characterization of Pseudomonas fluorescens isolated from bulk tank milk. J Dairy Sci 2001;84(6):1421-9.

22. Corona-Nakamura AL, Miranda-Novales MG, Leaños-Miranda B, Portillo-Gómez L, Hernández-Chávez A, Anthor-Rendón J, et al. Epidemiologic study of Pseudomonas aeruginosa in critical patients and reservoirs. Arch Med Res 2001;32(3):238-42.

23. EL-Roos Naa, Mazid Em, Zakary Em, El Yazid Kfa. Molecular characterization of Pseudomonas aeruginosa isolated from milk. Assiut Vet Med J 2013;59(139):9.

24. Prakash M, Rajasekar K, Karmegam N. Bacterial population of raw milk and their proteolytic and lipolytic activities. Res J Agri Biolo Sci 2007;3(6):848-51.

25. Samet-Bali O, Felfoul I, Lajnaf R, Attia H, Ayadi MA. Study of proteolytic and lipolytic activities of Pseudomonas spp. isolated from pasteurized milk in Tunisia. J Agric Sci 2013;5(7):46.

26. Younis G, Awad A, Maghawry M, Selim F. Extracellular enzymes and toxins of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinically diseased Egyptian cows. Adv Anim Vet Sci 2015;3(10):522-6.

27. Munsch-Alatossava P, Alatossava T. Antibiotic resistance of raw-milk-associated psychrotrophic bacteria. Microbiol Res 2007;162(2):115-23.

28. Sivaraj S, Murugesan P, Muthuvelu S, Purusothaman S, Silambarasan A. Comparative study of Pseudomonas aeruginosa isolate recovered from clinical and environmental samples against antibiotics. Int J Pharm Pharm Sci 2012;4(3):103-7.

29. Stefani S, Giovanelli I, Anacarso I, Condò C, Messi P, de Niederhäusern S, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in food-producing animals in Northern Italy. New Microbiol 2014;37(4):551-5.

30. Nasreen M, Sarker A, Malek MA, Ansaruzzaman M, Rahman M. Prevalence and resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa isolated from surface water. Biomed Life Sci 2015;5(1):74-81.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 21:31 IRDT on Friday June 22nd 2018