مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره اول، فروردین ۹۵
صفحه ۴۸ الی ۵۵

مقاله پژوهشی
(Original Article)

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

سید سهیل آقائی[1*]، علی جوادی[1]، یاسر شریفی[2]، عباس مروتی[1]

[1]گروه میکروب‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

[2]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

چکیده

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

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

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

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

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

*نویسنده مسئول مکاتبات:
سید سهیل آقائی، گروه میکروب‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
soheilaghaee@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۳۱

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

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

مقدمه

باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیرتخمیری متحرک با تک‌تاژه قطبی با نیازهای غذایی حداقل است. تمایل برای رشد در محیط‌های مرطوب، به موفقیت اکولوژی و اهمیت آن به‌عنوان یک بیماری‌زای مهم در عفونت‌های کسب‌شده بیمارستانی کمک می‌کند (۱). این باکتری یک پاتوژن فرصت‌طلب بوده که مقاومت فراوانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها کسب کرده است که همین امر باعث مشارکت فراوان آن در عفونت‌های بیمارستانی می‌شود، ضمن اینکه این ارگانیسم با ورود به خون می‌تواند باعث یکی از کشنده‌ترین سپتی‌سمی‌ها بین باکتری‌های گرم منفی شود (۳،۲). توانایی کلونیزه‌شدن این باکتری در مکان‌های مختلف، به‌خصوص در محیط بیمارستان بر اهمیت این باکتری در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی افزوده است (۴). توانایی این باکتری در تولید فاکتورهای بیماری‌زایی فراوان همچون آلژینات، پروتئازها، پیوسیانین، پیووردین، رامنولیپید، فسفولیپاز C، پیلی جهت اتصال و کلونیزاسیون به سلول‌های میزبان و تشکیل بیوفیلم باعث شده که در زمره مهم‌ترین پاتوژن‌ها قرار گیرد (۵). یکی دیگر از فاکتورهای مهم این باکتری، سیستم ترشحی نوع سوم است که عامل تزریق مستقیم یک‌سری از پروتئین‌ها به درون سیتوزول سلول هدف می‌باشد (۶). پنج آنزیم مهم شامل اگزوآنزیم T، U، S، Y و A به‌وسیله این سیستم به سلول هدف منتقل می‌شوند. اگزوآنزیم T و S، اولین آنزیم‌های شناخته‌شده در این گروه هستند. اگزوآنزیم S نیز یک نوع سیتوتوکسین است که در کلونیزه‌شدن باکتری نقش ایفا می‌کند. اگزوآنزیم T در هنگام انتشار و فرار پاتوژن تولید می‌شود. در ضمن هر دوی این اگزوآنزیم‌ها فعالیت ADP-ribosyltransferase دارند که از نظر پاتولوژی مشابه توکسین کلرا عمل می‌کنند (۷). تولید اگزوآنزیم Y نیز اثر نسبتاً کمی روی پنومونی موش و اثر معنی‌داری روی سایتوتوکسیتی سلول‌های MDCK دارد. اثر کشندگی اگزوآنزیم U روی سلول‌های MDCK حدود ۱۰۰ برابر اگزوآنزیم T تخمین زده شده است. همچنین حذف اگزوآنزیم U باعث کاهش اثر پاتوژن در ریه می‌شود. در ضمن، این فاکتور نقش مهمی در شوک سپتیک، شدت و کشندگی در پنومونی از خود نشان داده است (۸،۷). به‌طور خلاصه اگزوآنزیم‌های S و T، فعالیت ADP ریبوزیل ترانس‌فرازی دارند و باعث کاهش فعالیت ماکروفاژها و فاگوسیتوزها می‌شوند. اگزوآنزیم Y باعث افزایش فعالیت آدنیلات سیکلاز شده و روی مورفولوژی سلولی اثر دارد، اگزوآنزیم U نیز یک سیتوتوکسین مؤثر روی سلول‌های اپی‌تلیال و عامل آسیب‌های ریوی بوده و اثر سمّی روی ماکروفاژها دارد، اما مکانیسم عمل آن مشخص نشده است (۹). اگزوتوکسین مهم دیگر این باکتری، اگزوتوکسین A می‌باشد. این توکسین برای سلول‌های یوکاریوتیک سمّی بوده و می‌تواند پروتئین‌سازی را درون سلول مهار و باعث صدمات به بافت ریه و مغز شود. این توکسین نیز دارای فعالیت ADP ریبوزیل ترانس‌فرازی بوده و موجب القای تولید اینترلوکین-۱ می‌شود (۱۰). پتانسیل قوی *سودوموناس آئروژینوزا* برای حمل ژن‌های الحاقی غیرکروموزومی (روی پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها) می‌تواند دلیل خوبی برای وجود و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌خصوص هنگام مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باشد و حضور مقاومت به همراه فاکتورهای بیماری‌زایی نیز می‌تواند این باکتری را به‌عنوان یک پاتوژن بالقوه معرفی کند.

بتالاکتامازها در *سودوموناس آئروژینوزا* شامل ampC، Extended ESBLs (Spectrum Beta-lactamase) می‌باشند (۱۱). ampC کروموزومی است که بیان بیش از اندازه آن باعث پیدایش مقاومت به سفالوسپورین‌هایی همچون سفتازیدیم می‌شود (۱۲). چندین بتالاکتاماز مربوط به گروه ۱ در *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شده است که ازجمله مهم‌ترین آنها می‌توان به PER-1، TEM-42 و SHV-2a اشاره کرد. این آنزیم‌ها عامل مقاومت به یوریدوپنی‌سیلین، سفتازیدیم، سفپیروم و سفپیم می‌باشند (۱۳)

با توجه به مطالب بالا، مطالعه حاضر با هدف ردیابی ژن‌های اگزوتوکسین S، U، T، Y، A در *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم جداشده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر قم انجام شد.

روش بررسی

ابتدا ایزوله‌ها از بیمارستان‌های مختلف شهر قم جداسازی شدند.

از میان ۱۲۰ نمونه بالینی مورد بررسی، ۴۰ ایزوله از بیمارستان نکوئی، ۲۵ ایزوله از بیمارستان شهید بهشتی، ۲۲ ایزوله از بیمارستان کامکار جداسازی شد. این ایزوله‌ها از نمونه‌های ادرار، خون، سوختگی و سایر ایزوله‌ها نیز از نمونه‌های ریه جمع‌آوری شدند. جهت شناسایی، در ابتدا نمونه‌های گرم منفی در محیط TSB تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. سپس به‌صورت کشت خطی بر روی محیط‌های ستریمید آگار کشت داده شده و ۲۴ ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. سپس باکتری‌ها به محیط TSI منتقل و ایزوله‌هایی که واکنش آنها به‌صورت قلیایی (عدم تخمیر قندها) بدون تولید گاز و H_2S بود در محیط ستریمید آگار به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. سپس تک‌کلنی‌های رشدیافته، به محیط OF حاوی قند گلوکز انتقال یافتند. ایزوله‌هایی که در محیط OF باز (هوازی) رشد کرده و محیط را اسیدی (زرد) کرده بودند، اما در محیط OF بسته یا بی‌هوازی (با پارافین مایع استریل روی محیط پوشانده شده بود تا شرایط بی‌هوازی شود) رشد نکردند، به‌عنوان اکسیدکننده گلوکز (غیرتخمیری) یا هوازی شناسایی شدند. تمامی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی‌شده در محیط‌های TSB، با ۴۰٪ گلیسرول و نوترینت آگار نیم ظرفیت، به ترتیب در ۷۰- درجه سانتیگراد و در دمای آزمایشگاه جهت انجام آزمایشها ذخیره شدند (۱۴). برای آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن، تعداد ۱ یا ۲ کلنی از کشت خالص ۲۴ ساعته به لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل و به مدت 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 ۰/۵ مک‌فارلند به دست آید. برای انجام این کار، سوآب پنبه‌ای استریل به سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، آغشته و سپس سوآب مرطوب روی سطح پلیت ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط مولر هینتون آگار، ۳ بار با زاویه ۳۰ درجه به‌صورت خطوط رفت و برگشت نزدیک به‌هم کشت داده شد تا بدین ترتیب کل سطح محیط مولر هینتون آگار به‌صورت یکنواخت کشت داده شود. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت، عمل دیسک‌گذاری انجام شد و از دیسک‌های سفالوسپورینی نسل سوم (ساخت شرکت MAST) استفاده گردید. دیسک‌ها با پنس استریل به فاصله ۲۵ میلی‌متر از هم و ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار تلقیح‌شده، گذاشته شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. نتایج با ثبت قطر هاله عدم رشد و مقایسه با استانداردهای CLSI به دست آمد. باکتری جداشده ابتدا در محیط کشت Brain Heart Infusion Broth (Merk) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. ژنوم باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج (شرکت سیناکلون) استخراج گردید. در روند طراحی پرایمر، در ابتدا مقالات مربوطه مورد بررسی قرار گرفت و پس از مطالعه ویژگی‌های ژن‌های مختلف، از میان آنها ۵ ژن مهم مربوط به اگزوآنزیم‌های T، U، S، Y و اگزوتوگسین A انتخاب شدند که ساخت آن توسط شرکت سیناکلون صورت گرفته است. سکانس این ژن‌ها برای تشخیص اگزوتوگسین A، ۶۶۴ باز و برای اگزوآنزیم‌های T، S، U و Y به ترتیب ۴۷۱-۳۱۸-۸۸۴- ۱۰۱۸ جفت باز طراحی گردید.

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

جدول: سکانس پرایمرهای طراحی‌شده مورد استفاده در این مطالعه

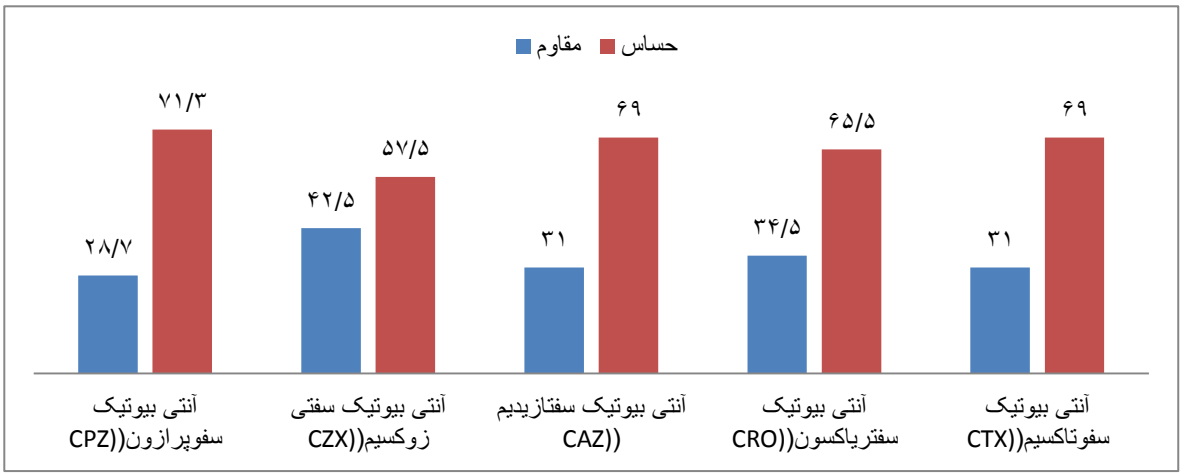
نام پرایمر	توالی پرایمر	نقطه ذوب	اندازه قطعه
Exo AF	CAGGTGATCCGCAACGCCC	60.8	664bp
Exo AR	TCAGCCGTTCGACCTCGCC	60.7	
Exo TF	GCCTGCTCTCCCGCCTGG	60.2	471bp
Exo TR	TTTCGCGCAGTTGCTCCGG	61	
Exo SF	GGATGCGGAAAAGTACCTGGGC	60.5	318bp
Exo SR	CTCCTCGCGACACCGGGG	60.9	
Exo UF	GTCGTCGGGGTGCCTGCC	60.8	848bp
Exo UR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

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

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

یافته‌ها

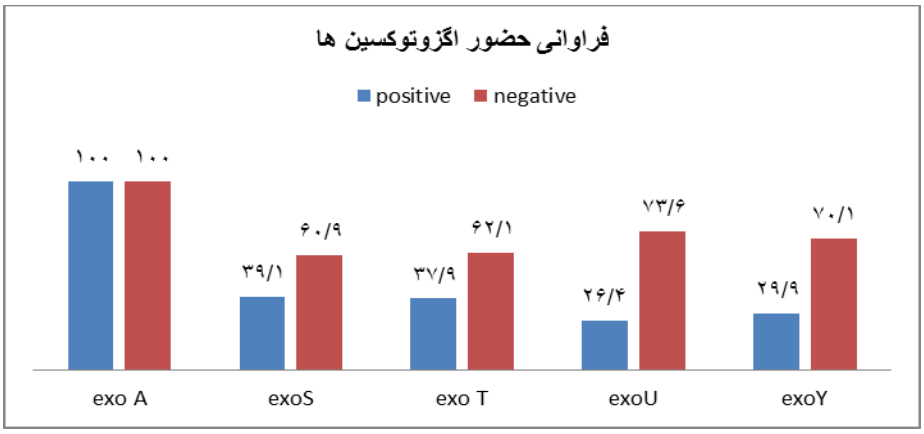
در زنان، ۳۶/۸٪ و در مردان، ۶۳/۲٪ آلودگی مشاهده گردید. میزان این باکتری در نمونه‌های پوست، خون، ریه و ادرار به ترتیب برابر ۶۳/۲، ۱۶/۱، ۱۶/۱ و ۴/۱٪ گزارش شد. بیشترین مقاومت به سفتی‌زوکسیم و بیشترین حساسیت به سفوپرازون در بین ایزوله‌ها وجود داشت (نمودار شماره ۱).



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

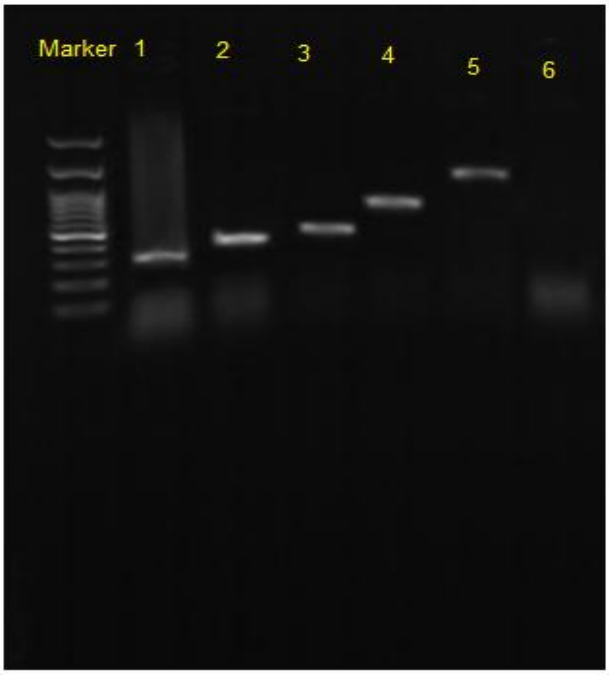
در نتایج PCR برای بررسی حضور ژن اگزوتوکسین‌ها، اگزوتوکسین A در تمامی ایزوله‌ها مشاهده گردید.

حضور ژن‌های اگزوتوکسین‌های S، T، U، Y در بین ایزوله‌ها به ترتیب ۲۹/۹، ۲۶/۴، ۳۷/۹، ۳۹/۱٪ به دست آمد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: فراوانی حضور اگزوتوکسین‌ها در نمونه‌های بالینی.

در شکل، نتایج الکتروفورز محصول واکنش‌های PCR برای تمامی ژن‌های اگزوآنزیم S قطعه ۳۱۸bp، اگزوآنزیم bp قطعه ۴۷۱T، اگزوتوگسین A قطعه ۶۶۴bp، اگزوآنزیم U قطعه ۸۴۸bp و اگزوآنزیم Y قطعه ۱۰۱۸bp، باندهای قابل‌انتظار را نشان داده است. از سویی، نتیجه الکتروفورز محصول PCR تیوب کنترل منفی، هیچ‌گونه تکثیری را نشان نداد که تأییدکننده صحت واکنش PCR فوق بود.



شکل: الکتروفوز ژن‌های مورد مطالعه :100bp Marker، شماره ۱- محصول PCR مربوط به ژن اگزوآنزیم S با اندازه ۳۱۸ باز؛ ۲- محصول PCR مربوط به ژن اگزوتوگسین T با اندازه ٤٧١ باز؛ ۳- محصول PCR مربوط به ژن اگزوتوگسین A با اندازه ٦٦٤ باز؛ ٤- محصول PCR مربوط به ژن اگزوآنزیم U با اندازه ٨٤٨ باز؛ ٥- محصول PCR مربوط به ژن اگزوآنزیم Y با اندازه ١٠١٨ باز؛ 6- کنترل منفی

بحث

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

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

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

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

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

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

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

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

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

References:

1. Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and practice of clinical bacteriology. 2nd ed. New York: Wiley Press; 2006. p. 427-31.

2. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principle and practice of infectious disease. 6th ed. New York: Churchill Livingstone Press; 2005. p. 216,1023-8.

3. Goldman E, Green L. Practical handbook of microbiology. 2nd ed. CRC Press; 2009. p. 216-30.

4. Topley WWC, Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. Washington D.C: Bacteriology ASM Press; 2005. p. 1591-603.

5. Ramos JL, Filloux A. Pseudomonas: Molecular microbiology and biodiversity, Infection. Washington D.C: Bacteriology ASM Press; 2010. p. 222-31. (Vol 6)

6. Lory S, Strom MS. Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of Pseudomonas aeruginosa-a review1. Gene 1997; 192(1):117-21.

7. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000;406(6799):959-64.

8. Mazel D. Integrons: Agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol 2006; 4(8):608-20.

9. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol 1995; 15(4):593-600.

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

11. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS). System report, data summary from January 1992 to June 2002. Am J Infect Control 2002;30(8):458-75.

12. Wilmoth D, Walters PE, Tomlin R, McCray SF. Caring for adults with cystic Fibrosis. Crit Care Nurse 2001;21(3):34-44.

13. Willcox MD, Holden BA. Contact lens related corneal infections. Biosci Rep 2001;21(4):445-61.

14. Lennette EH, Spaulding JP. Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology; 1974. p. 345-67.

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

16. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Appl Environ Microbiol 1994;60(10):3739-45.

17. Bayat E, Kamali M, Zareei Mohmoodabadi A, Mortazavi Y, Ebrahim Habibi A, Amini B, et al. Isolation, determination and cloning of translocation domain of exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. Trauma 2010;15(3):149-54.

18. Wolska K, Szweda P. Genetic features of clinical Pseudomonas aeruginosa strains. Pol J Microbiol 2009;58(3):255-60.

19. Pollack M, Taylor NS, Callahan L. Exotoxin production by clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 1977;15(3):776-80.

20. Berthelot P, Attree I, Plésiat P, Chabert J, de Bentzmann S, Pozzetto B, Grattard F, et al. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of Pseudomonas aeruginosa bacteremia isolates: Evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. J Infect Dis 2003;188(4):512-18.

21. Saeed HA, Awad AA. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to third generation cephalosporins. J Sci Tech 2009;10(2):195-200.

22. Anjum F, Mir A. Susceptibility pattern of Pseudomonas aeruginosa against various antibiotics. African J Microbiol Res 2010;4(10):1005-12.

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

Seyyed Soheil Aghaei[1*], Ali Javadi[1], Yaser Sharifi[2], Abbas Morovvati[1]

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

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

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

Email: soheilaghaee@yahoo.com

Received: 14 Apr, 2015

Accepted: 21 Jun, 2015

Abstract

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

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

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

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

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