

## ارزیابی فراوانی ژن کدکننده‌ی اگزوتوکسین ترش‌تیپ II در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بخش جراحی

مریم بهبودی پور<sup>1</sup>، ندا سلیمانی<sup>2</sup>، نگار آذرپیرا<sup>3</sup>، ندا سلیمانی<sup>4,5</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** سودوموناس آئروژینوزا، به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب یکی از مهم‌ترین علل عفونت‌های بیمارستانی است. بیماری‌زایی بالای آن را می‌توان به عوامل بیماری‌زای متعدد نسبت داد. شناسایی فاکتورهای بیماری‌زا می‌تواند به طراحی درمان‌های مؤثر کمک کند. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن حدت *toxA* در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بخش جراحی صورت پذیرفت.

**روش‌ها:** ۵۰ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های مختلف جمع‌آوری و با آزمایش‌های بیوشیمیایی مرسوم شناسایی شد. حساسیت ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار دیسک مورد آزمایش قرار گرفت. شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MAR) (Multiple Antibiotic Resistance) محاسبه گردید. DNA به روش جوشاندن استخراج شد و برای شناسایی ژن حدت *toxA* آزمایش PCR انجام شد.

**یافته‌ها:** از بین ۵۰ ایزوله، ۵۶ (درصد) از مردان و ۴۴ (درصد) از زنان جداسازی گردید. بیماران در بازه‌ی سنی ۱-۸۹ سال قرار داشتند. بیشترین جداسازی باکتری از بخش‌های جراحی (۲۶ درصد)، مراقبت ویژه (۲۴ درصد) و اورژانس (۱۸ درصد)، صورت پذیرفت. جدایه‌ها حساسیت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین (۶۲ درصد) و سفپیم (۶۰ درصد) نشان دادند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ای‌بی‌پنم (۴۶ درصد) مشاهده شد. ۴۴ درصد از جدایه‌ها دارای مقاومت چند دارویی (MDR) بودند. شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MAR) از ۰ تا ۱ متغیر بود. میانگین شاخص MAR جدایه‌ها ۰/۳۸ برآورد گردید. فراوانی ژن حدت *toxA* (۹۶ درصد) تعیین شد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه، شیوع بالای ژن فاکتور حدت *toxA* و اهمیت آن در بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا را برجسته می‌کند. شناسایی فاکتورهای حدت به منظور اقدامات مؤثر کنترل عفونت و توسعه استراتژی‌های درمانی هدفمند بسیار با اهمیت است.

**واژگان کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا؛ مقاومت آنتی‌بیوتیکی؛ سیستم‌های ترش‌تیپ نوع II؛ اگزوتوکسین A

**ارجاع:** بهبودی پور مریم، سلیمانی ندا، آذرپیرا نگار، سلیمانی ندا. ارزیابی فراوانی ژن کدکننده‌ی اگزوتوکسین ترش‌تیپ II در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بخش جراحی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۱۵): ۵۰۶-۵۱۴.

جریان خون، عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت‌های سیستمیک می‌شود (۳).

سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک پاتوژن مشترک در بیماران COVID-19 گزارش شده است (۴). بیماری مزمن انسدادی ریه، دیابت، فیبروز کیستیک، سرکوب سیستم ایمنی (پس از پیوند عضو یا مغز استخوان) و آسیب چند عضوی از عوامل خطر مرتبط با

### مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا، به‌عنوان یک باکتری گرم منفی مهم، نقش محوری را در عفونت‌های بیمارستانی بر عهده دارد به طوری که این باکتری به‌عنوان چهارمین پاتوژن بیمارستانی، مسئول ۱۰ درصد از کل عفونت‌های اکتسابی در بیمارستان است (۱، ۲). این پاتوژن باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از انواع عفونت‌ها، مانند ذات‌الریه، عفونت‌های

۱- دانشجو دکتری میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات پیوند، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴- استادیار، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۵- استادیار، گروه آسیب‌شناسی، مرکز پیوند شیراز، بیمارستان ابوعلی سینا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ندا سلیمانی؛ دانشیار، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

Email: n\_soleimani@sbu.ac.ir

بیمارستان نمازی و ابوعلی سینا شیراز و از نمونه‌های متفاوت همانند: زخم، خلط، خون، ادرار، دابل لومن، مایعات بدن، لوله تراشه و سایر قسمت‌ها جداسازی گردید. نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو کشت داده شدند و با استفاده از آزمایش‌های رایج میکروبیولوژی مربوط به سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدند. در این مطالعه از آزمون‌های نظیر: رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، تحرک (SIM) مصرف سیترات (کشت بر روی محیط سیمون سیترات)، تولید رنگدانه (کشت روی محیط سیتریماید آگار و مولر هیتون آگار)، تخمیر کربوهیدرات (کشت بر روی محیط سه قندی آهن‌دار (TSI) استفاده گردید (۱۷). سویه‌های باکتریایی در محیط TSB (Tryptic Soy Broth) با ۳۰ درصد گلیسرول (۷۰۰ میکرولیتر TSB + ۳۰۰ میکرولیتر گلیسرول) جهت ذخیره سازی در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند (۱۸).

#### تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

حساسیت جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک کربی - بائر مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI M100-Ed31) مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌های بالینی پس از تنظیم کدورت روی استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند بر روی محیط مولر هیتون آگار (MHA) به صورت چمنی تلقیح شدند. پس از آن، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفیم (۳۰ میکروگرم)، پیراسیلین/تازوباکتام (۱۰/۱۰ میکروگرم)، ایچی پنم (۱۰ میکروگرم)، آز ترونام (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم) و جنتامیسین (۱۰ میکروگرم) روی صفحات تلقیح شده، قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد و نتایج با استفاده از دستورالعمل‌های (CLSI) به صورت حساس، نیمه مقاوم و مقاوم تفسیر شدند. سویه‌ی مرجع سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853، به عنوان کنترل کیفیت مورد استفاده قرار گرفت. در تجزیه و تحلیل‌های بعدی، جدایه‌ها به صورت فنوتیپ مقاومت چندگانه (MDR) (Multiple Drug Resistant) و غیر MDR تقسیم‌بندی شدند. طبقه‌بندی ایزوله‌ها به عنوان MDR (مقاومت به حداقل یک عامل در  $\geq 3$  کلاس آنتی‌بیوتیک) صورت گرفت (۱۹).

#### محاسبه‌ی شاخص MAR

شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MAR) روش خوبی برای ارزیابی خطرات سلامتی است و منشأ ایزوله‌ها از منطقه‌ای با مصرف زیاد یا کم آنتی‌بیوتیک را مشخص می‌کند. شاخص  $MAR \geq 0.2$  منبع آلودگی پرخطر را نشان می‌دهد. این شاخص با تقسیم تعداد کل مقاومت مشاهده شده برای هر ایزوله (a) بر تعداد کل آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش (b) از طریق فرمول زیر محاسبه می‌گردد (۱۸).

عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا به شمار می‌روند (۵). درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا به دلیل مقاومت ذاتی این ارگانسیم و دستیابی به ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی (مانند کارباپنمازها)، به طور قابل توجهی چالش برانگیز است (۶). این پاتوژن توسط سازمان جهانی بهداشت در فهرست «پاتوژن‌های اولویت‌دار» قرار گرفته است (۷، ۸).

سودوموناس آئروژینوزا در محیط‌های بیمارستانی به دلیل سازگاری بالا و بهره‌وری از عوامل اتصالی قادر به حفظ بقای خود روی سطوح خشک و بی‌جان و دستگاه‌های پزشکی به مدت طولانی است (۹، ۱۰). از جنبه‌های اصلی موفقیت سودوموناس آئروژینوزا، می‌توان به پیچیدگی ژنومی گسترده و انعطاف‌پذیری متابولیکی آن که شامل چندین مکانیسم دفاعی ذاتی، مجموعه‌ای وسیع از ژن‌های حدت و ظرفیت تولید بیوفیلم است، اشاره داشت (۱۱). سودوموناس آئروژینوزا به فاکتورهای حدت متعدد از قبیل اده‌زین‌ها، لیپولی ساکاریدها و عوامل ترشحی، مانند اگزوتوکسین A، پروتئازها، اگزوانزیم‌ها، فسفولیپازهای C، پیوسیانین، آلزینات و DNase مجهز است (۱۲). در بین فاکتورهای ذکر شده اگزوتوکسین A به عنوان شایع‌ترین و سمی‌ترین عامل بیماری‌زای این باکتری شناخته شده است (۱۳). اگزوتوکسین A یک سم خارج سلولی کد شده توسط ژن *toxA* و یک پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای، با قطعات A و B است که توسط سیستم ترشحی نوع II سودوموناس آئروژینوزا ترشح می‌شود (۱۴، ۱۵). بخشی از این سم به عنوان ریبوزیل ترانس‌فراز آدنوزین دی‌فسفات (Adenosine diphosphate) ADP عمل می‌کند که به طور برگشت‌ناپذیری باعث ریبوزیل شدن فاکتور طول‌سازی EF-2 (Elongation factor 2) سلول یوکاریوتی می‌گردد (۱۶). این سم سنتز پروتئین را مهار می‌کند و پاسخ میزبان به عفونت را کاهش می‌دهد (۱۳). اگزوتوکسین A نقش مهمی در حدت سودوموناس آئروژینوزا دارد و با توجه به توسعه مداوم مقاومت ضد میکروبی در سویه‌های این ارگانسیم، نیاز روزافزونی به توسعه‌ی گزینه‌های درمانی نوآورانه وجود دارد. بنابراین ارزیابی فراوانی این اگزوتوکسین در نمونه‌های بالینی جهت دستیابی به اهداف جدید دارویی ضروری به نظر می‌رسد. از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن حدت *toxA* در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بخش جراحی صورت گرفته است.

#### روش‌ها

##### جداسازی و کشت

در طی یک مطالعه‌ی توصیفی - مقطعی در سال ۱۴۰۲، تعداد ۵۰ ایزوله غیر تکراری سودوموناس آئروژینوزا از بخش‌های مختلف

MAR index = a/b

### استخراج DNA

جهت استخراج ژنوم باکتری از روش جوشاندن استفاده شد. پس از تهیهی کشت تازه از باکتری، چند کلنی از هر سویه به ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید، سپس ورتکس شد و به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. سپس سوسپانسیون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاصل به عنوان DNA الگو جداسازی شد و در میکروتیوب‌های جدید در دمای ۲۰- درجهی سانتی‌گراد جهت استفاده در مراحل بعدی نگهداری گردید (۲۰). DNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

### تشخیص ژن حدت *toxA* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای

#### پلیمرز PCR

حضور ژن حدت، *toxA* (اگزوتوکسین A) در جدایه‌ها از طریق PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ بررسی شد. ویژگی هر پرایمر با استفاده از NCBI Primer-BLAST تأیید شد. جهت انجام واکنش، هر مخلوط در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر 2x PCR Master Mix Red - Mgcl2 2mM (آمپلیکون، دانمارک)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت (۱۰ pmol/μl)، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ pmol/μl)، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل آماده گردید. پس از تهیه مخلوط واکنش، میکروتیوب‌ها در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شدند و تحت شرایط زیر واکنش صورت پذیرفت: وا سرت اولیه ۹۵ درجهی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل: وا سرت در دمای ۹۵ درجهی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال ۵۴ درجهی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش ۷۲ درجهی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحلهی نهایی گسترش در دمای ۷۲ درجهی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. سویه‌ی سودوموناس آنروژینوزا ATCC 27853 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از انجام واکنش و الکتروفورز بر روی ژل آگارز، در نهایت آمپلیکون‌ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مشاهده شدند. تعیین اندازه باندها با استفاده از مارکر ۱۰۰ bp (پیشگام، ایران) صورت گرفت.

#### آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری توصیفی درصد حساسیت و مقاومت ایزوله‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵ (version 25, )

از IBM Corporation, Armonk, NY) انجام شد. مقادیر  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. این مقاله با کد اخلاق در پژوهش IR.SUMS.REC.1402.034 در دانشگاه علوم پزشکی شیراز به تصویب رسیده است.

#### یافته‌ها

#### توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده

بر اساس نتایج، از بین ۵۰ ایزوله جداسازی شده، ۲۸ (۵۶ درصد) ایزوله از مردان و ۲۲ (۴۴ درصد) ایزوله از زنان جدا سازی گردید. بیماران در بازه‌ی سنی ۱-۸۹ سال قرار داشتند و میانگین سنی آنها  $21/9 \pm 52$  سال برآورد گردید. بر اساس بخش، ۱۳ (۲۶ درصد) ایزوله از بخش جراحی، ۱۲ (۲۴ درصد) ایزوله از بخش مراقبت ویژه، ۹ (۱۸ درصد) ایزوله از بخش اورژانس، ۴ (۸ درصد) ایزوله از بخش داخلی، ۲ (۴ درصد) ایزوله از بخش انکولوژی و ۱۰ (۲۰ درصد) ایزوله از سایر بخش‌ها جدا سازی گردید. بر اساس نوع نمونه، ۱۱ (۲۲ درصد) ایزوله از زخم، ۱۱ (۲۲ درصد) ایزوله از خلط، ۹ (۱۸ درصد) ایزوله از ادرار، ۴ (۸ درصد) ایزوله از لوله تراشه، ۶ (۱۲ درصد) ایزوله از خون، ۳ (۶ درصد) ایزوله از مایعات بدن، ۲ (۴ درصد) ایزوله از دابل لومن و ۴ (۸ درصد) ایزوله از سایر نمونه‌ها جدا سازی شد. در شکل ۱ توزیع جدایه‌ها در بخش‌های مختلف بر حسب نوع نمونه قابل مشاهده است. همانگونه که مشخص است در بخش‌های جراحی، مراقبت ویژه و اورژانس به ترتیب بیشترین محل جداسازی باکتری از نمونه‌های زخم، خلط، لوله تراشه و ادرار صورت گرفته است.

#### الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

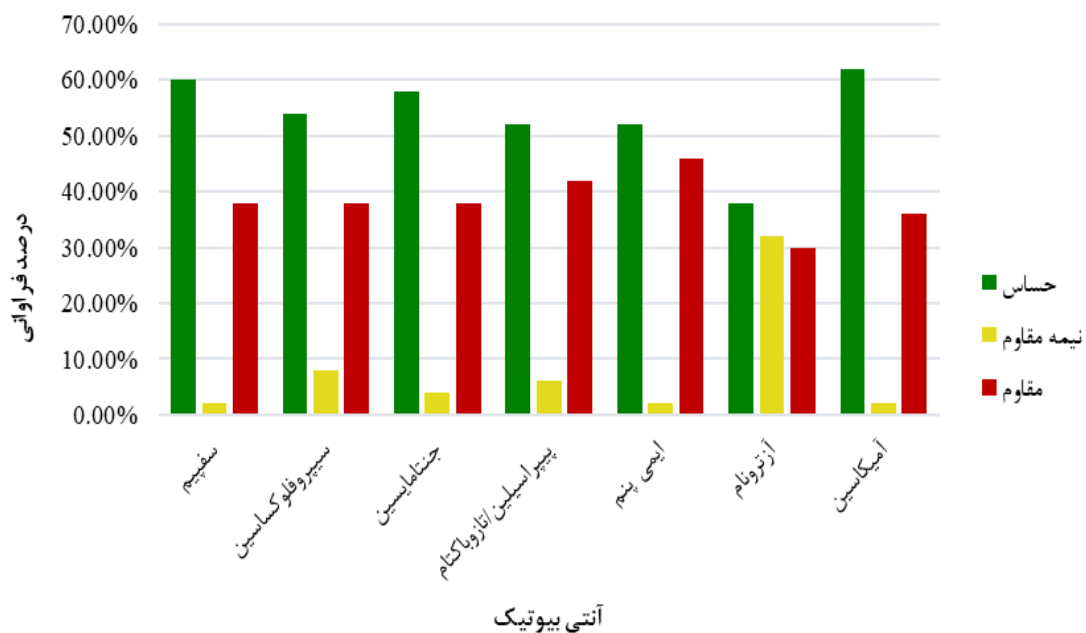
الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری سودوموناس آنروژینوزا جداسازی شده از بیماران، نسبت به کلاس‌های مختلف با عملکردهای متفاوت در شکل ۲ ذکر شده است. بر طبق نتایج، بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم (۴۶ درصد) و بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین (۶۲ درصد) و سفپیم (۶۰ درصد) مشاهده گردید. بر اساس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، جدایه‌ها به دو گروه MDR و غیر MDR تقسیم‌بندی شدند. از ۵۰ ایزوله مورد بررسی ۴۴ درصد از ایزوله‌ها دارای فنوتیپ MDR و ۵۶ درصد از ایزوله‌ها به صورت غیر MDR بودند.

جدول ۱- توالی پرایمر ژن *toxA* مورد استفاده

فاکتور ویروالانس	نام ژن	توالی پرایمر (5'→3')	طول پرایمر (bp)	اندازه محصول (bp)	Tm (°C)
اگزوتوکسین A	<i>toxA</i>	F: ACATCAAGGTGTTTCATCCAC	۲۰	۱۲۵	۵۵/۶
		R: GACGAAGAAGGTGGCATC	۱۸		۵۵/۵



شکل ۱. توزیع جدایه‌های سودوموناس آنروژینوزا برحسب بخش و نمونه



شکل ۲. نمودار آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا

### فراوانی ژن حدت *toxA*

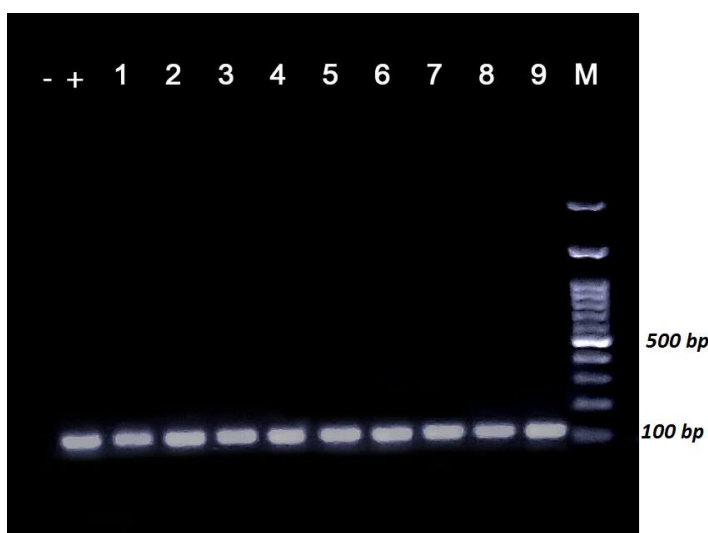
در این مطالعه، فراوانی ژن اگزوتوکسین A در جدایه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا با استفاده از آزمون PCR تعیین شد. باندهای با اندازه‌ی ۱۲۵ bp به عنوان قطعه مورد نظر تأیید گردیدند (شکل ۳). نتایج مربوط به نمونه‌های مثبت و منفی در جدول ۳ ذکر شده است.

### ارزیابی شاخص MAR

میزان شاخص MAR از ۰ تا ۱ در جدایه‌های مورد مطالعه متغیر بود. میانگین شاخص MAR برای جدایه‌های سودوموناس آنروژینوزا ۰/۳۸ برآورد گردید. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و شاخص MAR در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۲- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و شاخص MAR

الگو	الگوی مقاومت	تعداد ایزوله	شاخص MAR
۱	آزترونام	۲	۰/۱۴
۲	آزترونام، ایمی پنم	۱	۰/۲۸
۳	سفپیم، پیراسیلین/تازوباکتام	۱	۰/۲۸
۴	سفپیم، سیروفلوکساسین، ایمی پنم	۱	۰/۴۲
۵	آزترونام، سیروفلوکساسین، ایمی پنم	۱	۰/۴۲
۶	آزترونام، ایمی پنم، پیراسیلین/تازوباکتام، آمیکاسین، سفپیم	۱	۰/۷۱
۷	آمیکاسین، جنتامایسین، سفپیم، ایمی پنم، پیراسیلین/تازوباکتام	۲	۰/۷۱
۸	آمیکاسین، جنتامایسین، سیروفلوکساسین، ایمی پنم، پیراسیلین/تازوباکتام	۳	۰/۷۱
۹	آمیکاسین، جنتامایسین، سفپیم، سیروفلوکساسین، ایمی پنم، پیراسیلین/تازوباکتام	۴	۰/۸۵
۱۰	آزترونام، جنتامایسین، سفپیم، سیروفلوکساسین، ایمی پنم، پیراسیلین/تازوباکتام	۲	۰/۸۵
۱۱	آزترونام، آمیکاسین، جنتامایسین، سفپیم، سیروفلوکساسین، ایمی پنم، پیراسیلین/تازوباکتام	۸	۱

شکل ۳. تصویر ژل آگارز محصول PCR مربوط به ژن *toxA*. از سمت چپ به ترتیب کنترل منفی، کنترل مثبت، نمونه‌های مثبت (۹-۱) و مارکر (M) ۱۰۰ bp.جدول ۳- فراوانی ژن *toxA* در نمونه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا

نام ژن	موارد مثبت (درصد)	موارد منفی (درصد)	مجموع (درصد)
<i>toxA</i>	۴۸ (۹۶)	۲ (۴)	۵۰ (۱۰۰)

مجموع ۳۲ جدایه سودوموناس آنروژینوزا، ۲۸ جدایه از نمونه‌های سوختگی و ۴ جدایه از زخم جدا شد. بر اساس جنسیت و گروه سنی، بیشترین فراوانی در مردان (۵۶/۲ درصد) و در بیماران جوان (۳۰ درصد) در سنین ۲۳ تا ۲۸ سال مشاهده شد (۲۳). در مطالعه‌ی پیش‌رو نیز بیشترین جداسازی مربوط به مردان (۵۶ درصد) و میانگین سنی ۵۲ سال صورت پذیرفت. در تست حساسیت، نتایج نشان داد که مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی پنم (کارباپنم) بالاتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها است، که این موضوع بیانگر وضعیت چالش برانگیز درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آنروژینوزا است. از سوی دیگر، آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و

### بحث

با وجود پیشرفت در پروتکل‌های کنترل عفونت و مراقبت‌های پزشکی، همچنان سودوموناس آنروژینوزا به عنوان یکی از بدخیم‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب عامل عفونت در نواحی مختلف بدن گزارش شده است (۲۱)، (۲۲). در مطالعه‌ی حاضر، این باکتری از قسمت‌های مختلف بدن مانند زخم، خلط، خون، ادرار، مایعات بدن، دابل لومن، لوله تراشه جدا گردید. که این موضوع بیانگر توانایی این باکتری در آلوده‌سازی تمام بافت‌های بدن است. با این وجود بیشترین جداسازی سودوموناس آنروژینوزا مربوط به نمونه‌های زخم، خلط و ادرار بود. در مطالعه‌ی انجام شده در عراق، از

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 و IL-10 را کاهش می‌دهد و همچنین باعث فعال شدن دو کاسپاز درگیر در فرایند آپوپتوز می‌شود (۳۲، ۳۳). با توجه به اهمیت این فاکتور، در این مطالعه فراوانی ژن *toxA* مورد ارزیابی قرار گرفت. بر طبق نتایج ژن *toxA* فراوانی بالایی (۹۶ nvwn) در نمونه‌های مختلف داشت و این همسو با مطالعه‌ای بود که توسط Panahi و همکاران در شمال ایران انجام شد. این محققان، فراوانی ژن *toxA* را ۹۶ درصد گزارش کردند (۳۴).

مطالعه انجام شده توسط مرتضوی و همکاران نیز حاکی از شیوع بالای ژن اگزوتوکسین A (۸۷ درصد) در نمونه‌های بالینی جدا شده از زخم سسوخستگی بود (۳۵). در همین حال مطالعه‌ای که در عراق بر روی ۳۰ ایزوله‌ی جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی و محیطی بیمارستانی انجام شد. فراوانی این ژن ۱۰۰ درصد عنوان گردید (۳۶). تفاوت در فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A در مطالعات مختلف ممکن است با منابع مختلف جداسازی، ماهیت مکان، وضعیت سیستم ایمنی بیماران و همچنین تعداد نمونه‌ها مرتبط باشد (۲۳).

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، جدایه‌ها نسبت به آمینوگلیکوزیدهای آمیکاسین و جتتامایسین، سفالوسپورین سفیم بیشترین میزان حساسیت را داشتند. بنابراین، کنترل استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان برای جلوگیری از ظهور سویه‌های مقاوم و محدود کردن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صورت شناسایی سویه‌های مقاوم، امری ضروری به نظر می‌رسد. اگرچه بسیاری از سویه‌ها در این مطالعه، غیر MDR بودند، اما شیوع بالای ژن *toxA* در جدایه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا بیانگر نقش مهم این فاکتور حدت در بیماری‌زایی آن است و ممکن است به ایجاد عفونت‌های پایدار و مقاوم به دارو کمک کند. بنابراین، با توجه به پیشرفت مداوم مقاومت ضد میکروبی، شاید در آینده بتوان با طراحی ترکیبات مؤثر در برابر این عامل حدت، گام مهمی در کنترل شدت بیماری‌زایی ناشی از این ارگانیسم برداشت. در پایان، این مطالعه بر تجزیه و تحلیل مولکولی ژن‌های مقاومت و فاکتورهای حدت بیشتر در جدایه‌های بالینی مختلف سودوموناس آنروژینوزا تأکید می‌کند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه‌ی دکتری مریم بهبودی پور، دانشجوی دکتری میکروبیولوژی دانشگاه شهید بهشتی تهران با کد ۱۷۳۵۴۰۶ است. بدین وسیله از همکاری گروه میکروبیولوژی دانشگاه شهید بهشتی تهران، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا دانشگاه علوم پزشکی شیراز، کارکنان آزمایشگاه بیمارستان‌های نمازی و ابوعلی سینا شیراز قدردانی می‌گردد.

سفیم حساسیت نسبتاً بالاتری را نشان دادند. این یافته‌ها در راستای مطالعه‌ای است که در کشور پرتغال بر روی ۳۲ ایزوله بالینی سودوموناس آنروژینوزا صورت پذیرفت. در مطالعه ذکر شده ایزوله‌ها بیشترین میزان حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و جتتامایسین و بیشترین میزان مقاومت را نسبت به ایمپنم نشان دادند (۲۴). در مطالعه‌ی حاضر، میزان مقاومت به سفیم (۳۸ درصد) مشاهده گردید و این آنتی‌بیوتیک جز مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بود. همچنین، ۴۴ درصد از ایزوله‌ها دارای فنوتیپ MDR و ۵۶ درصد از ایزوله‌ها غیر MDR بودند.

در مطالعه‌ای که در کنیا بین سال‌های ۲۰۱۵ تا ۲۰۲۰ انجام شد، میزان مقاومت به سفیم پایین (۳۲ درصد) بیان شد. علاوه بر این شیوع کمتر، ۳۱ درصد سویه‌های MDR و شیوع بالاتر سویه‌های غیر MDR در بین جدایه‌های سودوموناس آنروژینوزا گزارش گردید (۲۵). با این حال فراوانی بالاتر ۵۵/۱ درصدی ایزوله‌های MDR در بیمارستان ضیاء الدین کراچی پاکستان ثبت شده است (۲۶).

مطالعات متعدد شواهد بیشتری از مشکل تشدید مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های سودوموناس آنروژینوزا ارائه می‌دهند (۲۷، ۲۸). متأسفانه آنتی‌بیوتیک‌هایی که زمانی در درمان این عفونت‌ها مؤثر بودند، اکنون بی‌اثر شده‌اند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که انتخاب درمان آنتی‌بیوتیکی باید با توجه به الگوهای خاص سودوموناس آنروژینوزا مورد توجه قرار گیرد. چرا که سویه‌های MDR با عوارض و مرگومیر بالاتر، به‌ویژه در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی و پیامدهای بالینی و اقتصادی منفی همراه هستند (۲۹). آنتی‌بیوگرام همراه با شاخص MAR یک ابزار اپیدمیولوژیک مهم برای نظارت بر مقاومت دارویی است. در این مطالعه شاخص‌های MAR، ۰/۷۱، ۰/۸۵ و ۱ بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌ها داشتند. هشت جدایه شاخص MAR برابر با ۱ داشتند (یعنی مقاوم به همه آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش‌شده)، که از این میان، چهار جدایه از بخش مراقبت ویژه جداسازی شدند. میانگین شاخص MAR برای تمامی ایزوله‌ها ۰/۳۸ محاسبه گردید. در همین راستا مطالعه‌ای که در جامائیکا بر روی نمونه‌های تنفسی انجام شده بود، میانگین شاخص MAR برای ایزوله‌های مقاوم ۰/۳۴ گزارش شد. شاخص MAR بالاتر از ۰/۲ نشان‌دهنده‌ی منابع پرخطر آلودگی است (۳۰).

با توجه به دشواری درمان عفونت‌های سودوموناس آنروژینوزا، شناسایی اهداف دارویی و توسعه‌ی درمان‌ها برای بهبود سلامت انسان ضروری به نظر می‌رسد. از آنجایی که سیتوتوکسین‌های سودوموناس آنروژینوزا نقش مهمی در پاتوژنز آن ایفا می‌کنند، هدف‌گیری این سموم به عنوان استراتژی‌های جدید برای کاهش حدت این ارگانیسم و ناتوان کردن آن در ایجاد بیماری می‌تواند مؤثر واقع شود (۳۱). اگزوتوکسین A به عنوان یکی از فاکتورهای حدت مهم سودوموناس آنروژینوزا علاوه بر مهار سنتز پروتئین میزبان و ترشح IL-18، تولید فاکتورهای ایمنی نظیر

## References

- Caffrey AR, Appaneal HJ, Liao JX, Piehl EC, Lopes V, Puzniak LA. Treatment Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Antibiotics (Basel)* 2022; 11(8): 1033.
- Reynolds D, Kollef M. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *pseudomonas aeruginosa* infections: an update. *Drugs* 2021; 81(18): 2117-31.
- Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Biswas R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol* 2016; 306(1): 48-58.
- Russell CD, Fairfield CJ, Drake TM, Turtle L, Seaton RA, Wootton DG, et al. Co-infections, secondary infections, and antimicrobial use in patients hospitalised with COVID-19 during the first pandemic wave from the ISARIC WHO CCP-UK study: a multicentre, prospective cohort study. *Lancet Microbe* 2021; 2(8): e354-e65.
- Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context* 2018; 7: 212527.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 45(6): 568-85.
- Balakashnan VS. WHO's first global infection prevention and control report. *Lancet Infect Dis* 2022; 22(8): 1122.
- Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol* 2019; 10: 539.
- Muggeo A, Coraux C, Guillard T. Current concepts on *Pseudomonas aeruginosa* interaction with human airway epithelium. *PLoS Pathog* 2023; 19(3): e1011221.
- Tuon FF, Dantas LR, Suss PH, Tasca Ribeiro VSJP. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review. *Pathogens* 2022; 11(3): 300.
- Verdial C, Serrano I, Tavares L, Gil S, Oliveira M. Mechanisms of Antibiotic and Biocide Resistance That Contribute to *Pseudomonas aeruginosa* Persistence in the Hospital Environment. *Biomedicines* 2023; 11(4): 1221.
- Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol* 2011; 61(4): 717-32.
- Newman JW, Floyd RV, Fothergill JL. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiol Lett* 2017; 364(15).
- Gholami A, Minai-Tehrani D, Mahdizadeh SJ, Saenz-Mendez P, Eriksson LA. Structural Insights into *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A-Elongation Factor 2 Interactions: A Molecular Dynamics Study. *J Chem Inf Model* 2023; 63(5): 1578-91.
- Zhang J, Wan C, Yu B, Gao C, Zhao L, Cheng X, et al. Prophylactic and therapeutic protection of human IgG purified from sera containing anti-exotoxin A titers against pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Hum Vaccin Immunother* 2019; 15(12): 2993-3002.
- Weldon JE, Pastan I. A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas exotoxin A* for the treatment of cancer. *FEBS J* 2011; 278(23): 4683-700.
- Hemmati J, Nazari M, Abolhasani FS, Ahmadi A, Asghari B. In vitro investigation of relationship between quorum-sensing system genes, biofilm forming ability, and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 2024; 24(1): 99.
- Gajdác M, Baráth Z, Kárpáti K, Szabó D, Usai D, Zanetti S, et al. No Correlation between Biofilm Formation, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Results from a Laboratory-Based In Vitro Study. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10(9):1134.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(3): 268-81.
- Plókarz D, Czopowicz M, Bierowiec K, Rypuła K. Virulence Genes as Markers for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation in Dogs and Cats. *Animals (Basel)* 2022; 12(4): 422.
- Bonyadi P, Saleh NT, Dehghani M, Yamini M, Amini K. Prevalence of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis infection: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog* 2022; 165: 105461.
- Nassar O, Desouky SE, El-Sherbiny GM, Abu-Elghait M. Correlation between phenotypic virulence traits and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microb Pathog* 2022; 162: 105339.
- Aljebory I. PCR detection of some virulence genes of *pseudomonas aeruginosa* in Kirkuk city, Iraq. *J Pharm Sci Res* 2018; 10(5): 1068-71.
- Silva A, Silva V, López M, Rojo-Bezales B, Carvalho JA, Castro AP, et al. Antimicrobial resistance, genetic lineages, and biofilm formation in *pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections: an emerging one health concern. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(8): 1248.
- Kiyaga S, Kyanya C, Muraya AW, Smith HJ, Mills EG, Kibet C, et al. Genetic Diversity, distribution, and genomic characterization of antibiotic resistance and virulence of clinical *pseudomonas aeruginosa* strains in Kenya. *Front Microbiol* 2022; 13: 835403.
- Farooq L, Memon Z, Ismail MO, Sadiq S. Frequency and antibiogram of multi-drug resistant *pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Care Hospital of Pakistan. *Pak J Med Sci* 2019; 35(6): 1622-6.
- Roulová N, Mot'ková P, Brožková I, Pejchalová M. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. *J Water Health* 2022; 20(4): 692-701.

28. Park Y, Koo SH. Epidemiology, Molecular Characteristics, and Virulence Factors of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infect Drug Resist* 2022; 15: 141-51.
29. Schwartz B, Klamer K, Zimmerman J, Kale-Pradhan PB, Bhargava A. Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Settings: A Review of Resistance Mechanisms and Treatment Strategies. *Pathogens* 2024; 13(11): 975.
30. Davis R, Brown PD. Multiple antibiotic resistance index, fitness and virulence potential in respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica. *J Med Microbiol* 2016; 65(4): 261-71.
31. Wood SJ, Goldufsky JW, Seu MY, Dorafshar AH, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxins: Mechanisms of Cytotoxicity and Impact on Inflammatory Responses. *Cells* 2023; 12(1): 195.
32. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci* 2021; 22(6): 3128.
33. Du X, Youle RJ, FitzGerald DJ, Pastan I. *Pseudomonas* exotoxin A-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1. *Mol Cell Biol* 2010; 30(14): 3444-52.
34. Panahi Z, Owrang M, Goli HR. Significant role of pyocyanin and exotoxin A in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients. *Folia Med (Plovdiv)* 2024; 66(1): 88-96.
35. Mortazavi SH, Ghaderi M, Hemmati M, Vaziri S, Azizi M, Kashef M, Ahmadi K. Molecular study of the prevalence of exotoxin A and alginate gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in burn wounds samples [in Persian]. *J Isfahan Med Sch* 2017; 34(412): 1537-43.
36. Hussein A, Abd F. Exotoxins A, T and S among *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates from Clinical and Hospital Environment Samples. *Journal of Global Pharma Technology* 2017; 9(7): 104.



## Frequency of Type II Secretory Exotoxin Encoding Gene in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Collected from Surgical Ward Patients

Maryam Behboudipour<sup>1</sup>, Neda Soleimani<sup>2</sup>, Negar Azarpira<sup>3</sup>, Neda Soleimani<sup>4,5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** As an opportunistic pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causes of hospital-acquired infections. Its high pathogenicity can be attributed to multiple virulence factors. Identifying pathogenic factors can help in designing effective treatments. The present study was conducted with the aim of investigating the pattern of antibiotic resistance and *toxA* virulence gene in clinical isolates of *P. aeruginosa* collected from surgical ward patients.

**Methods:** 50 isolates of *P. aeruginosa* were collected from different samples and identified using conventional biochemical tests. Antimicrobial sensitivity was tested using the disk diffusion method. The multiple antibiotic resistance index (MAR) was calculated. DNA was extracted using the boiling method, and PCR was performed to detect *toxA* virulence gene.

**Findings:** Among the 50 isolates, (56%) were obtained from men and (44%) from women. Patients were in the age range of 1-89 years. Most bacteria isolation was performed in the surgical unit (26%), intensive care unit (24%), and emergency unit (18%). Isolates exhibited high sensitivity to amikacin (62%) and cefepime (60%) antibiotics. The highest resistance rate was observed against imipenem (46%). Forty-four percent of the isolates were multidrug-resistant (MDR). The MAR index ranged from 0 to 1. The Mean MAR index of isolates was 0/38. Frequency of the *toxA* virulence gene (96%) was determined.

**Conclusion:** This study highlights the high prevalence of the virulence factor gene *toxA* and its importance in the pathogenicity of *P. aeruginosa*. Identification of virulence factors is crucial for effective infection control measures and the development of targeted therapeutic strategies.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance, Type II secretion systems, Exotoxin A

**Citation:** Behboudipour M, Soleimani N, Azarpira N, Soleimani N. Frequency of Type II Secretory Exotoxin Encoding Gene in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Collected from Surgical Ward Patients. J Isfahan Med Sch 2025; 43(815): 506-14.

1- PhD Candidate in Microbiology, Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3- Professor, Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

4- Assistant Professor, Department of Pathology, Shiraz Medical School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

5- Assistant Professor, Department of Pathology, Shiraz Transplant Center, Abu Ali Sina Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

**Corresponding Author:** Neda Soleimani, Associate Professor, Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran; Email: N\_soleimani@sbu.ac.ir