مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۹۲/هفته دوم مردادماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۰

مقایسه‌ی روش‌های کشت و PCR برای تشخیص اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا و فراوانی درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی نمونه‌های بالینی

معصومه دوستی[۱]، مهدی حاج اجاق فقیهی[۲]، دکتر علی رمضانی[۳]، دکتر محمدرضا صائینی[۴]

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی مهم گرم منفی است. به دلیل داشتن مقاومت ذاتی و اکتسابی به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد، نامطلوب شناخته شده است. روش‌های متفاوتی در آزمایشگاه بالینی برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا اعمال می‌شود. هدف از این مطالعه، مقایسه‌ی روش‌های فنوتیپی و تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا و فراوانی درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان ولی عصر (عج) زنجان بود.

روش‌ها: در این مطالعه، ۷۰ سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزا که از نمونه‌های بالینی متفاوت جدا شده بودند، به کار گرفته شد و وجود سودوموناس آئروژینوزا به واسطه‌ی قرار گرفتن روی محیط کشت ترکیبی (مولر هینتون آگار، بلاد آگار و مکانکی آگار) و همچنین انجام تست‌های بیوشیمیایی پایه مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت، آنتی‌بیوگرام به روش Kirby-Bauer در کنار آنتی‌بیوتیک‌های مختلف انجام شد. سپس DNA ژنومیک باکتری استخراج شده و توالی هدف مورد نظر به نام ژن اگزوتوکسین A تکثیر یافت.

یافته‌ها: در کل ۳۰۰ ایزوله در این مطالعه آنالیز شد که ۷۰ ایزوله به وسیله‌ی تست‌های فنوتیپی به عنوان سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده است. ژن ETA (Exotoxin A) در ۶۶ ایزوله‌ی آن از طریق PCR برای پرایمرهای اختصاصی ژن اگزوتوکسین A مثبت بودند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین یا پیپراسیلین بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشانگر آن است که روش PCR ذکر شده در بالا می‌تواند تشخیصی با حساسیت بالا، آسان، سریع و اختصاصی برای سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های بالینی فراهم کند. همچنین دقت در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان، از ایجاد سویه‌های مقاوم جلوگیری خواهد نمود.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، PCR، اگزوتوکسین A

مقدمه

سودوموناس ارگانیسمی گرم منفی و هوازی است که به وسیله‌ی ۳-۲ عدد فلاژل قطبی حرکت می‌کند. در آب و خاک یافت می‌شود و مهم‌ترین گونه‌ی بیماری‌زای آن در انسان، سودوموناس آیروژینوزا است. سودوموناس آیروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی می‌باشد و می‌تواند در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، سوختگی و سایر بخش‌ها ایجاد عفونت‌های ثانویه‌ی اکتسابی نماید. همچنین عامل اصلی عفونت در بیماران فیبروز کیستیک است. این ارگانیسم در محیط کشت، رنگدانه‌های متعددی تولید می‌کند که عبارت از رنگدانه‌ی پیوسیانین (رنگ آبی)، رنگدانه‌ی پیووردین (رنگ سبز)، رنگدانه‌ی پیوروبین (رنگ قرمز) و پیوملانین (رنگ سیاه) هستند.

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی مرکزی، واحد علوم و تحقیقات مرکزی، اراک، ایران
[۲] کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، بیمارستان حضرت ولی عصر(عج)، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
[۳] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
[۴] پزشک عمومی، گروه کنترل و پیش‌گیری بیماری‌ها، معاونت بهداشتی استان زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر علی رمضانی
Email: ramazania@zums.ac.ir

کلنی آن بوی خاص شبیه انگور یا گل یاس دارد که دلیل آن وجود ماده‌ای با نام آمینواستوفنن می‌باشد.

یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی این باکتری، اگزوتوکسین A (ETA یا Exotoxin A) می‌باشد (۱) که عملکردی مشابه سم دیفتری دارد و از تعدادی اسیدآمینه تشکیل شده است که توسط باکتری به محیط اطراف، ترشح می‌شود و با شکسته شدن اسیدآمینه‌ی انتهایی کربوکسیل اگزوتوکسین A، سم به گیرنده‌ی سلول‌های یوکاریوت متصل می‌شود (۳-۲).

سپس از طریق آندوسیتوز وارد سلول می‌شود و در آن جا می‌شکند و از گیرنده‌ی خود جدا می‌گردد (۴-۳). قطعه‌ای از انتهای اگزوتوکسین A جدا و وارد شبکه‌ی آندوپلاسمی می‌شود و از آن جا وارد سیتوزول می‌گردد و باعث غیر فعال شدن فاکتور طویل‌سازی و در نهایت توقف سنتز پروتئین و مرگ سلول می‌شود (۵، ۳).

بیش از ۹۰ درصد گونه‌های سودوموناس آیروژینوزا، سم اگزوتوکسین A تولید می‌کنند؛ چرا که ژن آن روی کروموزوم باکتری قرار دارد (۷-۶). یکی از مشکلات عمده‌ی عفونت با سودوموناس آیروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن است که اغلب درمان چند دارویی برای آن پیشنهاد می‌گردد.

مطالعات نشان می‌دهد که بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آیروژینوزا با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط وجود دارد و این مقاومت می‌تواند ذاتی (با منشأ کروموزومی) و یا اکتسابی (با منشأ پلاسمیدی) باشد (۳).

بنابراین گسترش روش‌های مولکولی منجر به درمان سریع و مؤثر بیماران می‌شود و از گسترش ایزوله‌های مقاوم باکتری‌ها جلوگیری می‌نماید. این مطالعه به تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آیروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی و مقایسه‌ی روش‌های تشخیص باکتری و ژن ETA به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی پرداخت.

روش‌ها

در مدت یک سال ۳۰۰ نمونه‌ی مختلف بالینی مانند ادرار، خون، زخم و ترشحات ریه از بخش مراقبت‌های ویژه و سایر بخش‌های بیمارستان ولی‌عصر (عج) زنجان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها جهت جداسازی سودوموناس آیروژینوزا روی محیط‌های بلاد آگار و مکانکی آگار کشت داده شدند. کلنی‌های مشکوک مجدد کشت داده و خالص شدند.

شناسایی اولیه بر اساس آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، TSI، تخمیر انواع قندها، آزمون سیترات، اندول، VP، MR، رشد در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رنگ، تولید رنگ‌دانه‌ها، بررسی حرکت روی محیط SIM و بوی خاص انجام شد. نمونه‌های سودوموناس آیروژینوزا که توسط تست‌های بیوشیمیایی یافت شده بودند، توسط تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و بر اساس استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (۷) که در آن سوسپانسیون میکروبی معادل نیم McFarland روی محیط مولر هینتون آگار کشت گردید، ارزیابی شدند.

دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۶ میکروگرم)، پیراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) بودند که به فاصله‌ی ۲/۴ سانتی‌متر از یکدیگر (مرکز یک دیسک

www.mui.ac.ir

تا مرکز دیسک دیگر) روی محیط مورد نظر جاگذاری شدند. بعد از ۲۴–۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری شد و نتایج آن ثبت گردید. از سویه‌ی سودوموناس آیروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان شاهد مثبت و از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

برای استخراج DNA و انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) از روش Boilling استفاده گردید. ابتدا چند کلنی تازه از محیط کشت حاوی سودوموناس آیروژینوزای خالص در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه یا آب مقطر استریل به شکل سوسپانسیون در آورده شد و به مدت ۱۵دقیقه در حرارت ۱۰۰درجه‌ی سانتی‌گراد جوشانده شد و سپس با دور rcf ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی که حاوی DNA باکتری بود، برای PCR استفاده و رسوب آن کنار گذاشته شد.

جهت تأیید درجه‌ی خلوص DNA در نمونه‌های استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر استفاده شد. میزان خلوص DNA با نسبت ۲۶۰ روی ۲۸۰ نشان داده شد.

برای انجام PCR از جفت پرایمرهای ETA۱ با ردیف پرایمری GA CAA CGC CCT CAG CAT 5′–CAC CAG-3' و ETA۲ با ردیف پرایمری 5′–CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGC GCT-3' با طول محصول ۳۶۷ bp استفاده گردید (۸).

همچنین از Master mix که حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر $Mgcl_2$ ۲/۵ میلی‌مول، ۱ میکرولیتر dNTPs ۲/۵ میلی‌مول و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Tag پلیمراز (۵ واحد) بود، به همراه ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۲ میکرولیتر DNA الگو با حجم ۲۵ میکرولیتر آماده و در دستگاه Bio Rad قرار داده شد. شرایط Setup واکنش PCR برای شناسایی ژن ETA در سودوموناس آیروژینوزا در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. شرایط Setup واکنش PCR برای شناسایی ژن ETA (Exotoxin A) در سودوموناس آیروژینوزا

زمان	درجه‌ی حرارت (سانتی‌گراد)		
۵ دقیقه	۹۵		First Denaturation
۱ دقیقه	۹۵	Denaturation	Loop: 30
۱دقیقه	۵۴	Annealing	
۱ دقیقه	۷۲	Extension	
۱۰ دقیقه			Extension final

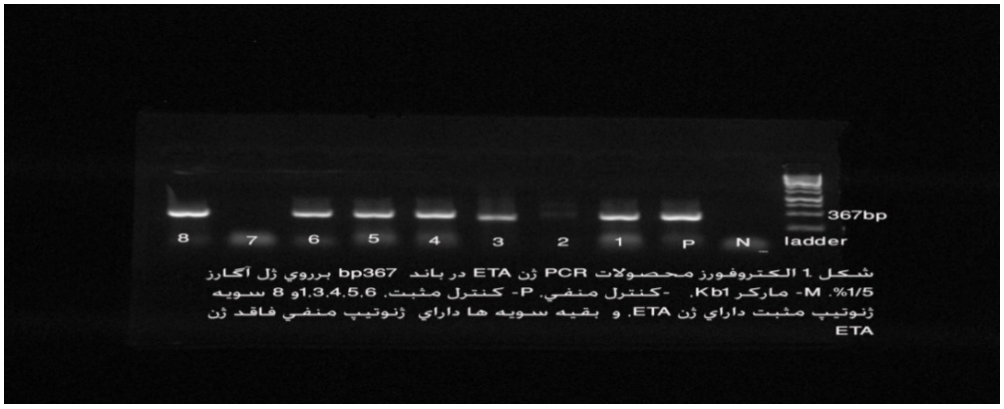
پس از شناسایی باکتری با روش‌های بیوشیمیایی و مشاهده‌ی میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، DNA باکتری استخراج شد و وجود ژن اگزوتوکسین A روی کروموزوم باکتری با روش تکثیر به کمک PCR و در کنار مارکر bp ۱۰۰ بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید مشاهده شد (شکل ۱).

یافته‌ها

نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام به روش Kirby-Bauer بر روی ایزوله‌های سودوموناس آیروژینوزا در جدول ۲ آورده شده است.

بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم (۹۸/۶ درصد)، سفوتاکسیم (۹۱/۷ درصد) و سفتازیدیم (۷۸/۹ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین با ۴۰/۶ درصد و پیپراسیلین با ۴۴/۹

www.mui.ac.ir



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن ETA (Exotoxin A)

جدول ۲. درصد حساسیت و مقاومت سویه‌های سودوموناس آیروژینوزای جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه

آنتی‌بیوتیک	مقاوم	نیمه‌حساس	حساس
ایمی‌پنم	۶۳/۸	۰	۳۶/۲
پیپراسیلین	۴۴/۹	۴/۳	۵۰/۷
سیپروفلوکساسین	۴۰/۶	۱/۴	۵۸
جنتامایسین	۵۵/۱	۲/۹	۴۲
مروپنم	۹۸/۶	۰	۱/۴
سفتازیدیم	۷۸/۹	۳/۵	۱۷/۵
سفوتاکسیم	۹۱/۷	۰	۸/۳

درصد بود. از بین ۳۰۰ نمونه‌ی مورد مطالعه، ۷۰ ایزوله‌ی سودوموناس آیروژینوزای به روش فنوتیپی یافت شد که ۹۴/۳ درصد (۶۶ ایزوله) از نظر اگزوتوکسین A، از طریق PCR مثبت شدند.

جدول ۳. انواع، تعداد و درصد ایزوله‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه

نوع نمونه	سوش‌های ایزوله شده	
	تعداد	درصد
ترشحات ریه	۵۴	۷۷/۱
ادرار	۷	۱۰
مدفوع	۴	۵/۷
زخم	۲	۲/۸
خلط	۲	۲/۸
چشم	۱	۴/۱

در این مطالعه مشاهده شد که بیشترین ایزوله‌های مثبت مربوط به بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بود. همچنین بالاترین درصد تعداد سوش‌های ایزوله شده مربوط به ترشحات ریه بود (جدول ۳).

بحث

در این مطالعه، مقایسه‌ی روش تشخیص فنوتیپی و ژنوتیپی سودوموناس آیروژینوزا و فراوانی درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی نمونه‌های بالینی بیمارستان انجام گرفت. این باکتری پاتوژن فرصت‌طلب به عنوان دومین عامل عفونت‌های سوختگی و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی شناخته می‌شود و باعث مرگ بیماران با ضعف سیستم ایمنی می‌شود (۹).

تنوع ژنتیکی این باکتری به علت توانایی سازگاری با میزبان‌ها و محیط‌های مختلف است که ایجاد واکنش‌های فنوتیپی متفاوتی می‌کند. بنابراین برای شناسایی آن نمی‌توان فقط به تست‌های فنوتیپی اکتفا کرد، هر چند که روش فنوتیپی روش دقیقی برای تشخیص می‌باشد؛ اما روش‌های مولکولی جهت شناسایی ایزوله‌های غیر تیپیک مؤثرتر و دقیق‌تر هستند (۱۱-۱۰).

www.mui.ac.ir

اگزوتوکسین A سمی‌ترین پروتئین سودوموناس آیروژینوزا می‌باشد. تا سال ۱۹۸۴ تنها منبع پروتئین اگزوتوکسین A سودوموناس آیروژینوزا، استخراج پروتئین از خود باکتری بود که اولین بار توسط دکتر لو از سودوموناس آیروژینوزا جدا شد (۱۲).

Khan و Cerniglia برای اولین بار از اگزوتوکسین A برای شناسایی باکتری سودوموناس آیروژینوزا استفاده کردند (۱۳). اگزوتوکسین A توسط کیوانی امینه و قاسمیان صفایی استخراج گردید (۱۴).

ضمن بررسی الگوی مقاومت، مشاهده شد که ۲۹/۵ درصد از ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم نسبت به سیپروفلوکساسین یا پیپراسیلین حساس هستند و این دو دارو مؤثرترین آنتی‌بیوتیک در درمان سودوموناس آیروژینوزا می‌باشند و میزان مقاومت به آن‌ها از سایر آنتی بیوتیک‌ها کمتر است.

در این تحقیق بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم بود که توصیه می‌شود از مصرف این سه آنتی‌بیوتیک خودداری شود. تشخیص مولکولی سودوموناس آیروژینوزا ذکر شده در بالا می‌تواند تشخیصی با حساسیت بالا، آسان، سریع و اختصاصی برای سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های بالینی فراهم کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به سرعت بالا و مزایای روش‌های مولکولی در تشخیص باکتری‌های مولد عفونت‌های بیمارستانی، PCR راهی مناسب در شناسایی عامل بیماری است و عامل مؤثری در انتخاب روش‌های پیش‌گیری و درمان مناسب عفونت‌های سودوموناس می‌باشد که می‌تواند مانع از ایجاد عوارض بیشتر عفونت در بیماران شود. همچنین نتایج کلی تحقیق، نشان از افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد.

می‌توان با انتخاب داروهای مناسب از طریق اصلاح و یا تغییر پروتکل‌ها در روند درمان بیماران، با جدیت بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، از شیوع آنزیم‌های ایجاد کننده‌ی مقاومت و گسترش عفونت‌های بیمارستانی جلوگیری کرد.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم بخش میکروب‌شناسی بیمارستان حضرت ولی‌عصر (عج)، همکاران محترم بخش بیوتکنولوژی دانشکده‌ی داروسازی و همکاران محترم واحد بیماری‌های مرکز بهداشت استان زنجان که با همکاری خود ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. 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.
2. Chang JH, Kwon HY. Expression of 14-3-3delta, cdc2 and cyclin B proteins related to exotoxin A-induced apoptosis in HeLa S3 cells. Int Immunopharmacol 2007; 7(9): 1185-91.
3. Bayat E, Kamali M, Zare'ei Mahmoodabadi A, Mortazavi Y, Ebrahim Habibi A, Amini B, et al. Isolation, determination and cloning of translocation domain of exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. Kowsar Med J 2010; 15(3): 149-54.
4. Xiao X, Zhang J, Gong J, Pan Y, Yu Y, Yang X, et al. Rapid detection of Pseudomonas aernginosa by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targetting ETA gene. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2008; 24(4): 581-5. [In Chinese].
5. Wolf P, Elsasser-Beile U. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. Int J Med Microbiol 2009; 299(3): 161-76.
6. Holder IA. Pseudomonas immunotherapy: a historical overview. Vaccine 2004; 22(7): 831-9.

www.mui.ac.ir

7. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2005; 4(Suppl 2): 37-43.
8. Song KP, Chan TK, Ji ZL, Wong SW. Rapid identification of Pseudomonas aeruginosa from ocular isolates by PCR using exotoxin A-specific primers. Mol Cell Probes 2000; 14(4): 199-204.
9. Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients. Burns 2010; 36(1): 70-4.
10. Aslani MM, Sharafi Z, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Ebrahimipour Gh, Hashemipour M. Molecular detection and identification of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound and burn infections. Pejouhandeh 2011; 15(6): 286-92.
11. Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify Pseudomonas aeruginosa and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2003; 41(9): 4312-7.
12. Yates SP, Merrill AR. A catalytic loop within Pseudomonas aeruginosa exotoxin A modulates its transferase activity. J Biol Chem 2001; 276(37): 35029-36.
13. 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.
14. Keyvani Amineh H, Ghasemian Safaei H. Purification of exotoxin A from Pseudomonas aeroginosa. J Tehran Vet Med 2000; 56: 33-6.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 192, 2nd week, August 2012 Received: 11.4.2012 Accepted: 9.6.2012

Comparison of Conventional Culture Methods and Polymerase Chain Reaction (PCR) for Specific Detection of *Pseudomonas Aeruginosa*

Massumeh Doosti[1], Mehdi Haj Ojagh Faghihi MSc[2], Ali Ramazani PhD[3], Mohammad Reza Saini MD, MPH[4]

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa),* a major gram-negative opportunistic nosocomial pathogen, is notoriously known because of its intrinsic and acquired multiple antibiotic resistances. Different methods are applied in the clinical laboratory to detect *Pseudomonas aeruginosa*. The aim of this study was to compare culture and molecular diagnostic assays for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: In this study, 70 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens were used. The specimen was examined for the presence of *Pseudomonas aeruginosa* by plating onto a combination of culture media (Muller Hinton agar, Blood agar, and McConkey agar) and also basic biochemical testes. In addition, from the culture, genomic bacterial DNA was extracted and was amplified employing sequence-specific target, namely the exotoxin A (ETA) gene locus by polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings: From the total 300 isolates analyzed in this study, 70 were found by phenotypic tests as *P. aeruginosa*. The ETA gene was found in 66 isolates (94.3%) by PCR with exotoxin A primers.

Conclusion: These results suggest that the PCR-method mentioned above can be used to provide a specific, rapid, simple, and highly sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Polymerase chain reaction (PCR), Exotoxin A

[1] MSc Student, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
[2] Department of Microbiology, Vali-e-Asr Hospital, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Biotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.
[4] General Practitioner, Center for Disease Control and Prevention, Vice-Chancellor for Health, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.
Corresponding Author: Ali Ramazani PhD, Email: ramazania@zums.ac.ir