مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ٤١٢/هفته‌ی چهارم بهمن ماه ١٣٩٥

تاریخ دریافت: ١٣٩٥/٦/٧
تاریخ پذیرش: ١٣٩٥/٧/١٣

بررسی مولکولی فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلژینات در ایزوله‌های Pseudomonas Aeruginosa جدا شده از نمونه‌های زخم سوختگی

سید حمیدرضا مرتضوی[١]، مهدی قادری[٢]، میترا همتی[٣]، سیاوش وزیری[٤]، محسن عزیزی[٥]، مهسا کاشف[٥]، کمال احمدی[٥]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Pseudomonas aeruginosa از جمله عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی است که دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی سازگاری محیطی بالایی است. هدف از انجام این مطالعه، تعیین فراوانی ژن‌های alg D و Exotoxin A (ETA) در ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa جدا شده از زخم سوختگی بود.

روش‌ها: در این مطالعه، تعداد ١٨٨ نمونه‌ی جدا شده از زخم سوختگی مورد بررسی قرار گرفت. پس از شناسایی ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa با استفاده از روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی، آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به روش انتشار از دیسک (Kirby-Bauer) انجام گرفت. سپس، از پرایمرهای اختصاصی جهت تعیین ژن‌های alg D و ETA در میان ایزوله‌ها استفاده گردید. داده‌های به دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: از ١٨٨ نمونه‌ی اخذ شده از بیماران، در نهایت ٩١ نمونه‌ی Pseudomonas aeruginosa تشخیص داده شد. فراوانی (درصد) مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفپیم، آمیکاسین، سفتازیدیم، جنتامایسین، پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین و ایمی‌پنم به ترتیب ٨٠ (٨٧/٩ درصد)، ٧٧ (٨۴/۶ درصد)، ۶٩ (٧۵/٨ درصد)، ۶٧ (٧٣/۶ درصد)، ۶۶ (٧٢/۶ درصد)، ۶٣ (۶٩/٢ درصد)، ۶٢ (۶٨/٢ درصد) و ۵٣ (۵٨/٢ درصد) بود. فراوانی (درصد) نتیجه‌ی مثبت واکنش Polymerase chain reaction (PCR) برای ژن‌های alg D و ETA به ترتیب ٨٨ (٩۶/٧ درصد) و ٧٩ (٨٧/٠ درصد) به دست آمد.

نتیجه‌گیری: فراونی بالای ژن‌های alg D و ETA و همچنین مقاومت دارویی بالا، نشان دهنده‌ی افزایش قابلیت بیماری‌زایی این ارگانیسم و درمان مشکل بیماران مبتلا به عفونت زخم سوختگی می‌باشد. از این رو، شناسایی و تشخیص به موقع این پاتوژن‌های مقاوم، می‌تواند در انتخاب راه‌کارهای مناسب جهت پیش‌گیری و درمان مناسب مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: Pseudomonas aeruginosa، ژن alg D، Exotoxin A

ارجاع: مرتضوی سید حمیدرضا، قادری مهدی، همتی میترا، وزیری سیاوش، عزیزی محسن، کاشف مهسا، احمدی کمال. **بررسی مولکولی فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلژینات در ایزوله‌های Pseudomonas Aeruginosa جدا شده از نمونه‌های زخم سوختگی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ١٣٩٥؛ ٣۴ (۴١٢): ١۵۴٣-١۵٣٧

مقدمه

Pseudomonas aeruginosa، یک باکتری گرم منفی و از جمله مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب در منابع بیمارستانی به خصوص در بخش‌های سوختگی و جراحی محسوب می‌شود و می‌تواند در تعداد زیادی از افراد بستری در این مراکز درمانی همچون مبتلایان به سرطان، بیماران نقص ایمنی، سیستیک فیبروزیس و سایر بیماران، عفونت‌های خطرناک و تهدید کننده‌ی حیات را ایجاد کند (٢-١).

این باکتری، از عوامل اصلی مرگ و میر در بیماران مبتلا به سوختگی‌های شدید محسوب می‌شود (٣) و دارای طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زایی شامل انواع اگزوتوکسین‌ها، لیپو پلی‌ساکارید، پیلی، فسفولیپازها، الاستاز، پروتئازها، آلژینات و ... است (۴).

اگزوتوکسین A (ETA یا Exotoxin A)، یک پروتئین ۶۶ کیلو

١- استادیار، گروه اطفال، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
٢- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران
٣- دانشیار، گروه اطفال، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۴- دانشیار، گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۵- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: کمال احمدی
Email: kamal.ahmadi55@yahoo.com

دالتونی و عامل اصلی بیماری‌زایی Pseudomonas aeruginosa است که توسط سیستم ترشحی نوع II در مرحله‌ی سکون رشد و کمبود منابع آهن در دسترس باکتری تولید می‌شود. این توکسین، دارای مکانیسم عمل شبیه توکسین دیفتری است که با ریبوزیله کردن عامل طویل‌سازی (Eukaryotic elongation factor یا EF2) و مهار پروتئین‌سازی، باعث مرگ سلولی در میزبان می‌شود (۵). این توکسین، در حدود ۹۰ درصد از ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa وجود دارد و ژن آن بر روی کروموزوم باکتری قرار گرفته است (۶). در اغلب بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری، اگزوتوکسین A قابل جداسازی است (۷).

آلژینات، از جمله دیگر عوامل ویرولانس Pseudomonas aeruginosa است که توسط ژن alg D کد می‌شود. در حدود ۱۲ ژن مختلف در ساخت آلژینات دخیل هستند که عملکرد همه‌ی این ژن‌ها، تحت کنترل پروموتر alg D می‌باشد. نقش آلژینات در Pseudomonas aeruginosa، شامل جلوگیری از خروج باکتری از ریه و در نتیجه کمک به پایداری باکتری در این بافت، عمل به عنوان ادهسین، تشکیل بیوفیلم و ایجاد ظاهر براق در کلنی‌های این میکروارگانیسم می‌باشد (۹-۸).

مسأله‌ی وجود مقاومت دارویی در Pseudomonas aeruginosa، یکی از مشکلات اصلی در روند درمان بیماران بستری در مراکز درمانی از جمله افراد دچار سوختگی محسوب می‌شود. این باکتری دارای مقاومت بالایی به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل انواع بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها و سایر داروها است (۱۰). از جمله عوامل اصلی ایجاد مقاومت دارویی در این باکتری، می‌توان به تولید بتالاکتامازها، وجود پمپ‌های ترشحی و ایجاد تغییرات در غشای خارجی آن اشاره کرد (۱۱).

امروزه، به دلیل وجود سطح بالایی از مقاومت‌های ذاتی و اکتسابی در Pseudomonas aeruginosa نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب و مؤثر برای درمان عفونت‌های حاصل از آن با مشکل روبه‌رو شده است (۱۲). با توجه به این که مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلژینات Pseudomonas aeruginosa در این منطقه انجام نشده بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین فراوانی این ژن‌ها در سویه‌های Pseudomonas aeruginosa جدا شده از نمونه‌های زخم سوختگی بیماران در بیمارستان امام خمینی (ره) شهر کرمانشاه در سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ انجام شد.

روش‌ها

این پژوهش، از نوع توصیفی- مقطعی بود که طی یک دوره‌ی ۶ ماهه از آبان ماه سال ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ۱۳۹۵ انجام گرفت. در این مطالعه، از ۱۸۸ بیمار بستری در بخش سوانح سوختگی بیمارستان امام خمینی (ره) شهر کرمانشاه که دچار زخم سوختگی بودند و بیش از یک هفته آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند، در موقع تعویض پانسمان نمونه‌ی زخم سوختگی اخذ گردید. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، در شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال یافتند و بعد از کشت بر روی محیط‌های کشت Blood agar و Nutrient agar (Highmedia, India) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. در ادامه، برای شناسایی و تأیید نهایی باکتری Pseudomonas aeruginosa از سایر میکروارگانیسم‌ها، از محیط کشت و آزمایش‌های اختصاصی باکتری‌شناسی شامل Triple sugar iron agar (TSI)، Sulfide Indole Motility (SIM)، Methyl red (MR)، Voges-Proskauer (VS)، Oxidative-fermentative (OF)، اکسیداز، کاتالاز، لیزین دکربوکسیلاز، اندول، تولید سیترات و پیگمان استفاده شد. بعد از شناسایی ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa از نمونه‌های مورد بررسی، موارد تشخیص داده شده‌ی این باکتری، پس از تلقیح به محیط نگهدارنده در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۳).

در ادامه، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و با به کارگیری استاندارد ۰/۵ McFarland و مطابق با دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گرفت (۱۴).

در این مطالعه، از سویه‌ی استاندارد Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 به منظور کنترل کیفی واکنش‌ها استفاده گردید. در ابتدا، باکتری‌های جدا شده بر روی محیط Muller-Hinton (Highmedia, India) کشت داده شدند. برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری، از ۸ دیسک آنتی‌بیوتیکی (Highmedia, India) شامل سفتازیدیم، آمیکاسین، جنتامایسین، پیپراسیلین، سفوتاکسیم، سیپروفلوکساسین، سفپیم و ایمی‌پنم استفاده شد.

در مرحله‌ی بعد، جهت بررسی فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلژینات به کمک پرایمرهای اختصاصی طبق جدول ۱، واکنش Polymerase chain reaction (PCR) انجام شد (۱۶-۱۵). ابتدا کل محتوای ژنومی باکتری با روش Boiling استخراج شد. به این منظور، چندین کلنی خالص باکتری در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و پس از ۵ دقیقه جوشاندن و خنک شدن در مرحله‌ی بعد، در دور ۷۰۰۰ g (Relative centrifugal force یا RCF) به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جهت انجام واکنش PCR به لوله‌های اپندورف جدید منتقل شد و به عنوان DNA باکتری به کار

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها و چرخه‌های دمایی مورد استفاده برای شناسایی **Pseudomonas aeruginosa**

پرایمر	توالی (3'-5')	اندازه‌ی محصول (bp)	۳۵ چرخه		
			Extension ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد	Annealing ۱ دقیقه	Denaturation ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد
اگزوتوکسین (ETA) A	5'- CAGGTGATCCGCAACGCCC -3' 5'- TCAGCCGTTCGACCTCGCC -3'	۶۶۴	۷ دقیقه	۶۰/۸ درجه‌ی سانتی‌گراد	۱ دقیقه
آلژینات (alg D)	5'-TTCCCTCGCAGAGAAAACAT -3' 5'-CCTGGTTGATCAGGTCGATCT-3'	۵۲۰	۷ دقیقه	۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد	۱ دقیقه

رفت. برای واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، از ۵/۱۲ میکرولیتر Master Mix (شرکت سیناکلون ایران)، ۳ میکرولیتر DNA باکتری، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. مراحل دمایی واکنش PCR شامل Denaturation اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه طبق جدول ۱ و در پایان ۵ دقیقه Extension در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک بررسی شد. نتایج به دست آمده، به همراه مشخصات نمونه‌های مورد بررسی جمع‌آوری گردید و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

از مجموع ۱۸۸ نمونه‌ی بالینی جمع‌آوری شده، تعداد ۹۱ (۴۸/۴ درصد) ایزوله‌ی Pseudomonas aeruginosa شناسایی شد. بیماران مورد بررسی از سن ۶۹-۱۵ سال و با میانگین سنی ۱۰/۰ ± ۳۲/۶ سال بودند. از این تعداد ایزوله، ۵۱ مورد (۵۶/۱ درصد) در مردان و ۴۰ مورد (۴۳/۹ درصد) در زنان بود.

بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌ها نسبت به سفوتاکسیم (۸۷/۹ درصد) و سفپیم (۸۴/۶ درصد) و همچنین، کمترین مقاومت در برابر ایمی‌پنم ۵۳ (۵۸/۲ درصد) مشاهده شد (جدول ۲). با توجه به نتایج جدول ۳، فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلژینات (alg D) به ترتیب شامل ۸۷/۰۰ درصد و ۹۶/۷ درصد مشخص شد. نتایج الکتروفورز محصول واکنش PCR ژن‌های ETA و alg D در شکل ۱ آمده است.

بحث

به دلیل توانایی در ایجاد طیف وسیعی از انواع عفونت‌های بیمارستانی توسط Pseudomonas aeruginosa، جداسازی و شناسایی عوامل ویرولانس این باکتری در مراکز درمانی از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعات مختلف انجام گرفته، میزان شیوع متفاوتی از حضور Pseudomonas aeruginosa در نمونه‌های بالینی جدا شده از انسان گزارش شده است. در این پژوهش، این فراوانی به میزان ۴/۴۸ درصد مشاهده شد. برای مثال، این میزان را در مطالعات داخل و خارج از کشور به ترتیب ۴۷/۰۰ درصد، ۴۶/۴۷ درصد، ۳۷/۳ درصد و ۲۹/۶ درصد عنوان کرده‌اند (۲۰-۱۷). یافته‌های این مطالعات، با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد.

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های **Pseudomonas aeruginosa** نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت تعداد (درصد)	حساسیت حد واسط تعداد (درصد)	میزان حساسیت تعداد (درصد)
جنتامایسین	۶۶ (۷۲/۶)	۴ (۴/۴۰)	۲۱ (۲۳/۰۰)
پیپراسیلین	۶۳ (۶۹/۲)	۲ (۲/۲۰)	۲۶ (۲۸/۶)
آمیکاسین	۶۹ (۷۵/۸)	۰ (۰/۰۰)	۲۲ (۲۴/۲)
سفتازیدیم	۶۷ (۷۳/۶)	۶ (۷/۶۰)	۱۸ (۱۹/۷)
سفپیم	۷۷ (۸۴/۶)	۰ (۰/۰۰)	۱۴ (۱۵/۴)
سفوتاکسیم	۸۰ (۸۷/۹)	۰ (۰/۰۰)	۱۱ (۱۲/۱)
سیپروفلوکساسین	۶۲ (۶۸/۲)	۱۱ (۱۲/۰۰)	۱۸ (۱۹/۸)
ایمی‌پنم	۵۳ (۵۸/۲)	۳ (۳/۳۰)	۳۵ (۳۸/۵)

جدول ۳. فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین A و آلژینات بر اساس تعداد موارد مثبت و منفی در ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa

ژن‌های مورد بررسی	موارد مثبت تعداد (درصد)	موارد منفی تعداد (درصد)	مجموع تعداد (درصد)
اگزوتوکسین A (ETA)	۷۹ (۸۷/۰)	۱۲ (۱۳/۰)	۹۱ (۱۰۰)
آلژینات (alg D)	۸۸ (۹۶/۷)	۳ (۳/۳)	۹۱ (۱۰۰)

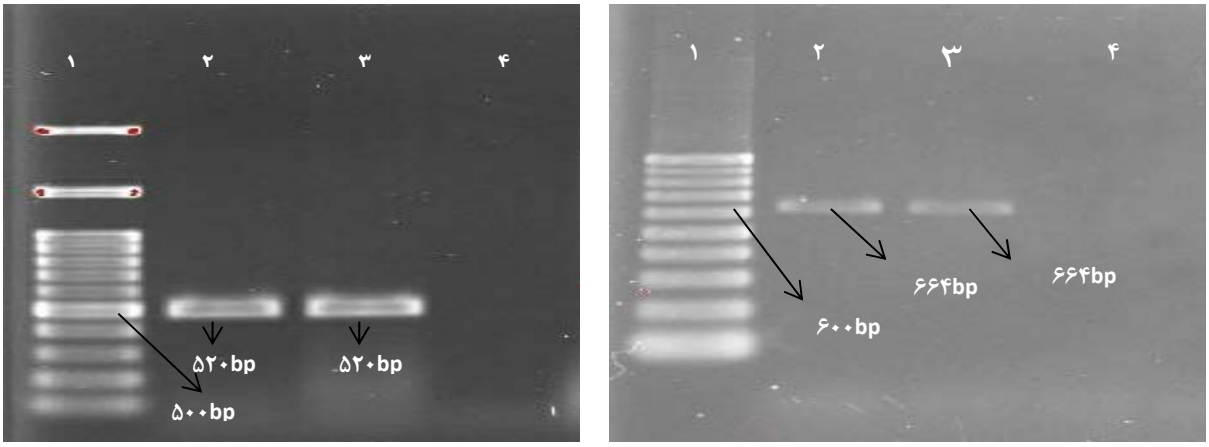
در این مطالعه، ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa فقط از بیماران دچار سوختگی جدا شد. با توجه به این که وجود سطح بالایی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری Pseudomonas aeruginosa جدا شده از بیماران سوختگی در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است، (۲۱، ۱۱)، در این پژوهش نیز میزان بالایی از مقاومت دارویی در بین این ایزوله‌ها مشاهده گردید. یکی از دلایل احتمالی این امر، می‌تواند جداسازی این باکتری‌ها از نمونه‌های سوختگی در بیماران باشد.

بیشترین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این مطالعه در سفوتاکسیم (۸۷/۹ درصد)، سفپیم (۸۴/۶ درصد)، آمیکاسین (۷۵/۸ درصد) و سفتازیدیم (۷۳/۶ درصد) و کمترین میزان مقاومت در ایمی‌پنم (۵۸/۲ درصد) مشاهده گردید. در مطالعه‌ی اخوان تفتی و همکاران (۱۱) بر روی Pseudomonas aeruginosa، میزان مقاومت نسبت به جنتامایسین، پیپیراسیلین، سفپیم و ایمی‌پنم به ترتیب ۷۳، ۷۰، ۶۲ و ۷۴ درصد گزارش شد. با توجه به این که در این مطالعه نیز نمونه‌ها فقط از بیماران سوختگی جدا شده بود، نتایج این مطالعه، با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. در نتیجه، می‌توان گفت که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری در بیماران بستری در بیمارستان‌ها به خصوص افراد دچار سوانح سوختگی در حال افزایش می‌باشد.

از جمله آنتی‌بیوتیک‌های رایج که به میزان زیادی در بیماران سوختگی مورد استفاده قرار می‌گیرد، ایمی‌پنم است که متأسفانه به دلایلی از جمله مصرف بی‌رویه و از طرفی، کسب مقاومت به آن در Pseudomonas aeruginosa، میزان مقاومت به آن روند رو به رشدی یافته است. میزان مقاومت دارویی به این آنتی‌بیوتیک در این پژوهش، ۵۸/۲ درصد مشخص شد. در سایر مطالعات، همسو با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، مقاومت نسبت به ایمی‌پنم به ترتیب ۷۴، ۵۴ و ۵۲/۹ درصد گزارش شده است (۲۳-۲۱).

با توجه به این که اگزوتوکسین A، عامل اصلی بیماری‌زایی Pseudomonas aeruginosa است و در مطالعات قبلی، میزان آن بین ۱۰۰-۷۴ درصد گزارش شده است (۲۵-۲۴، ۱۶-۱۵). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در ۷۹ مورد (۸۷ درصد) از مجموع ۹۱ ایزوله‌ی Pseudomonas aeruginosa مورد بررسی، ژن ETA وجود دارد که با یافته‌های سایر مطالعات همسو بود، اما در مطالعه‌ی فاضلی و ممتاز، میزان شیوع این ژن در ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa، ۳۵/۲۹ درصد گزارش شد که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مغایرت داشت (۱۷).

از جمله دیگر عوامل مهم در بیماری‌زایی Pseudomonas aeruginosa، آلژینات است که با جلوگیری از دسترسی سیستم ایمنی میزبان، باعث افزایش توان بیماری‌زایی این پاتوژن فرصت‌طلب می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ۸۸ ایزوله (۹۶/۷ درصد) از مجموع



شکل ۱. نتایج Polymerase chain reaction (PCR) ژن‌های اگزوتوکسین A (ETA) و آلژینات (alg D)

ETA: ۱- نشانگر (۱۰۰ bp)، ۲- شاهد مثبت (۶۶۴ bp)، ۳- نمونه‌ی مثبت (۶۴۴ bp) و ۴- شاهد منفی

alg D: ۱- نشانگر (۱۰۰ bp)، ۲- شاهد مثبت (۵۲۰ bp)، ۳- نمونه‌ی مثبت (۵۲۰ bp) و ۴- شاهد منفی

۹۱ ایزوله‌ی Pseudomonas aeruginosa مورد بررسی، دارای ژن آلژینات می‌باشند. در مطالعات انجام گرفته، میزان فراوانی آلژینات در این باکتری بین ۱۰۰-۸۱/۷ درصد گزارش شده است (۲۸-۲۶). در مطالعه‌ی ولدبیگی و همکاران (۱۵)، میزان شیوع ژن آلژینات در مجموع نمونه‌های مورد بررسی ۹۲ درصد بود، اما در تمامی ایزوله‌های جدا شده‌ی Pseudomonas aeruginosa از بیماران دچار سوختگی در این مطالعه، همچون مطالعه‌ی پورزرشکی و همکاران (۲۶)، ژن مولد آلژینات وجود داشت.

در مطالعه‌ی حاضر، اغلب ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa مورد بررسی، دارای سطح بالایی از مقاومت آنتی‌بیوتیک بودند و درصد زیادی از این باکتری‌ها هر دو ژن اگزوتوکسین A و آلژینات را داشتند. با توجه به این که بیماران دارای سوختگی به علت ضعیف شدن سطح ایمنی بدن و از طرفی نیاز به بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان‌ها در معرض عفونت‌های خطرناک و مقاوم به درمانی هستند و همچنین، تمامی ایزوله‌های مورد بررسی در این پژوهش از بیماران دچار سوختگی جدا شد، می‌توان یکی از دلایل احتمالی این مقاومت‌ها را فراوانی بالایی وجود این دو عامل ویرولانس Pseudomonas aeruginosa نام برد. با توجه به فراوانی بالای ژن‌های اگزوتوکسین A و آلژینات و همچنین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در ایزوله‌های مورد بررسی، که باعث افزایش قابلیت بیماری‌زایی این ارگانیسم‌ها و به دنبال آن بروز اختلال در روند درمان بیماران می‌شود، شناسایی و تشخیص به موقع این پاتوژن‌های مقاوم، می‌تواند در انتخاب راه‌کارهای مناسب در جهت پیش‌گیری و درمان مناسب آن‌ها مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه که هزینه‌ی این طرح را از محل بودجه‌ی طرح جذب پژوهشگر به شماره‌ی ۹۴۴۵۲ تأمین نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Akya A, Salimi A, Nomanpour B, Ahmadi K. Prevalence and clonal dissemination of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in Kermanshah. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(7): e20980.
2. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs 2007; 67(3): 351-68.
3. Alhazmi A. Pseudomonas aeruginosa – pathogenesis and pathogenic mechanisms. International Journal of Biology 2015; 7(2): 44-67.
4. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a hospital from a rural area. Indian J Med Res 2005; 121(5): 701-3.
5. Al-Daraghi WA, Abdullah ZH. Detection of exotoxin a gene in Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples. Journal of Al-Nahrain University 2013; 16(2): 167-72.
6. 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].
7. Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS. Early detection of Pseudomonas aeruginosa--comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). Ann Clin Microbiol Antimicrob 2004; 3: 21.
8. Hafiane A, Ravaoarinoro M. Characterization of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cystic fibrosis patients by different typing methods. Pathol Biol (Paris) 2011; 59(5): e109-e114.
9. Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of Pseudomonas aeruginosa alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. Mol Microbiol 2005; 56(2): 309-22.
10. 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. [In Persian].
11. Akhavan Tafti F, Zandi H, Vakli M, Mousavi SM, Zarei M. Frequency of β-lactamase and metallo-β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn wounds in Yazd burn hospital during 2011-2012. Feyz 2014; 18(2): 167-74. [In Persian].
12. Wang H, Tu F, Gui Z, Lu X, Chu W. Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Indian J Microbiol 2013; 53(2): 163-7.
13. 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.
14. Clinical Laboratory Standards Institute. M100-S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second international supplement. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2012. p. 50-1.
15. Valadbeigi H, Sadeghifard N, Rafiei Tabatabaei R, Maleki A. A study on the frequency of toxin A, alginate genes, and of clinical Pseudomonas aeroginosa strains. J Ilam Univ Med Sci 2012; 20(1): 58-64. [In Persian].
16. 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. [In Persian].
17. Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian hospital infections. Iran Red Crescent Med J 2014; 16(10): e15722.
18. Yousefi Mashouf R, Esmaeili R, Alikhani MY, Ghanbari M. Evaluation of exotoxin A gene and frequency of polymerase chain reaction sensitivity in detection of pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Tehran Univ Med J 2014; 72(3): 167-73. [In Persian].
19. Zavascki AP, Barth AL, Fernandes JF, Moro AL, Goncalves AL, Goldani LZ. Reappraisal of Pseudomonas aeruginosa hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo-beta-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. Crit Care 2006; 10(4): R114.
20. Ranjan KP, Ranjan N, Bansal SK, Arora DR. Prevalence of Pseudomonas aeruginosa in post-operative wound infection in a referral hospital in Haryana, India. J Lab Physicians 2010; 2(2): 74-7.
21. Abdi-Ali A, Nikbin V, Feizabadi MM, Gharavi S, Fallahi Z. Study of Plasmid Profile and Antibiotic Resistance in Hospital Pseudomonas aeruginosa. Iranian Journal of Biology 2005; 18(2): 141-9.
22. Fazeli H, Fatahi Bafghi M, Faghri M, Akbari R. Molecular Study Of PER and VEB genes is multidrug resistant Pseudomonas Aeroginosa isolated from clinical specimens in Isfahan/Iran and their antibiotic resistance patterns. J Kerman Univ Med Sci 2012; 19(4): 345-53. [In Persian].
23. Mirsalehian A, Akbari Nakhjavani F, Bahador A, Jabal ameli F, Bigverdi R, Goli H. Prevalence of MBL-producing Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Tehran Univ Med J 2011; 68(10): 563-9. [In Persian].
24. Imani Foolad A, Hosainzadeh M, Mousavi S F. Association between exotoxin A (exo-A) gene and antibiotic resistance pattern with biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. J Ardabil Univ Med Sci 2011; 11(1): 7-13. [In Persian].
25. Amini B, Kamali M, Zarei Mahmod abadi A, Mortazavi Y, Ebrahim habibi A, Bayat E, et al. Cloning of catalytic domain of exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. J Zanjan Univ Med Sci 2010; 18(71): 24-33. [In Persian].
26. Pourzereshki N, Naserpour Farivar T, Peymani A. Presence of alginate among multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical samples in Qazvin and Tehran hospitals. J Clin Res Paramed Sci 2015; 3(4): 257-63. [In Persian].
27. Rashno TS, Khansarinejad B, Abtahi H, Najafimosleh M, Ghaznavi-Rad E. Detection of algD, oprL and exoA Genes by new specific primers as an efficient, rapid and accurate procedure for direct diagnosis of Pseudomonas aeruginosa strains in clinical samples. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(10): e13583.
28. Stehling EG, Silveira WD, Leite DS. Study of biological characteristics of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. Braz J Infect Dis 2008; 12(1): 86-8.

Journal of Isfahan Medical School Received: 28.08.2016

Vol. 34, No. 412, 4th Week, February 2017 Accepted: 04.10.2016

Molecular Study of the Prevalence of Exotoxin A and Alginate Gene in Pseudomonas Aeruginosa Isolates in Burn Wounds Samples

Seyed Hamidreza Mortazavi[1], Mehdi Ghaderi[2], Mitra Hemmati[3], Siavash Vaziri[4], Mohsen Azizi[5], Mahsa Kashef[5], Kamal Ahmadi[5]

Original Article

Abstract

Background: Pseudomonas aeruginosa is one of the major nosocomial pathogens with a vast antibiotic resistance and great ability in adaptation with environment. The purpose of this study was to evaluate the antibiotic resistance and bacterial detection using Exotoxin A (ETA) and algD genes in patients with burns wound infection.

Methods: In this study, 188 samples were evaluated with standard bacteriological methods. After antibiotic resistance evaluation with disc diffusion method (Kirby-Bauer), specific primers for detection of algD and ETA genes among bacterial isolate were used. All data were analyzed using SPSS software.

Findings: From 188 taken samples, 91 isolates were Pseudomonas aeruginosa. The antibiotic resistance rate for cefotaxime, cefepime, amikacin, ceftazidime, gentamicin, piperacillin, ciprofloxacin and imipenem were 80 (87.9%), 77 (84.6%), 69 (75.8%), 67 (73.6%), 66 (72.6%), 63 (69.2%), 62 (68.2%) and 53 (58.2%), respectively. The prevalence of algD and ETA genes were 88 (96.7%) and 79 (87.0%), respectively.

Conclusion: The high prevalence of algD and ETA genes among burns wound infections demonstrates the increase in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa and problems with burn wound infection treatment. Therefore, accurate and rapid diagnosis of resistant Pseudomonas aeruginosa can be useful in taking proper strategy for prevention and treatment of such infections.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, algD gene, Exotoxin A (ETA) gene

Citation: Mortazavi SH, Ghaderi M, Hemmati M, Vaziri S, Azizi M, Kashef M, et al. **Molecular Study of the Prevalence of Exotoxin A and Alginate Gene in Pseudomonas Aeruginosa Isolates in Burn Wounds Samples.** J Isfahan Med Sch 2017; 34(412): 1537-43.

1- Assistant Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
2- Department of Microbiology, School of Science, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran
3- Associate Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
4- Associate Professor, Department of Infectious Disease, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
5- Department of Microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
Corresponding Author: Kamal Ahmadi, Email: kamal.ahmadi55@yahoo.com