



Frequency of *exoY*, *exoS*, *exoT* and *exoU* genes among *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from patients in Tehran hospitals by Multiplex PCR

Maryam Mahdavi¹, Taghi Zahraei Salehi², Kumarss Amini¹, Parisa Mobasseri³

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary medicine, Tehran University, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Biology sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/04/17
Accepted: 2016/07/24
Available online: 2016/10/17

Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2017; 11(1): 09-17

Corresponding author at:

Taghi Zahraei Salehi

Department of Microbiology,
Faculty of Veterinary
medicine, Tehran University,
Tehran, Iran

Tel: 0989121597067

Email:

tsalehi@ut.ac.ir

Abstract

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative pathogen that causes a variety of serious infections predominantly in immunocompromised patients. To promote severe illness, *P. aeruginosa* uses a type III secretion system to inject toxic effector proteins into the cytoplasm of eukaryotic cells. Four effector proteins have been described in *P. aeruginosa*: ExoU, ExoS, ExoT, and ExoY. The aim of the study was to determine the prevalence of the type III secretion system toxins-encoding genes among *P. aeruginosa* isolates collected from different clinical specimens such as urine, wound, blood and respiratory secretions from patients.

Materials and Methods: 55 *Pseudomonas aeruginosa* isolates were identified from hospitalized patients in Tehran during 2015 – 2016, using conventional microbiological tests. The susceptibility of isolates to antibiotics were assessed using disk diffusion test. After DNA extraction, Multiplex PCR was performed on the *P. aeruginosa* isolates to detect the secretion toxins-encoding genes.

Results: High resistance rates were seen for cefipime (89%), ceftazidime (85.45%), aztreonam (83.63%), tobramycin (78.18%) and gentamicin (60%). The prevalence of the genes among all isolates was as follows; *exoT* (76.32%), *exoS* (30.90%), *exoY* (14.54%) and *exoU* (67.27%). *exoU* was more prevalent among MDR than in non-MDR strains (81.3% versus 16.6%). *exoU*⁺ isolates were more likely to be fluoroquinolone-resistant than *exoS*⁺ isolates (32% versus 17%).

Conclusions: Type III secretion system toxins-encoding genes found in isolated *P. aeruginosa*, in which *exoT*, *exoU* and *exoS* gene detected in most isolates while *exoY* gene was detected in minority of the isolates.

KeyWords: *Pseudomonas aeruginosa*, Type III secretion system, Multiplex PCR

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Mahdavi M, Zahraei Salehi T, Amini K, Mobasseri P. Frequency of *exoY*, *exoS*, *exoT* and *exoU* genes among *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from patients in Tehran hospitals by Multiplex PCR. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (1): 09-17



Farname Inc.

بررسی فراوانی ژن های *exoU* و *exoT* *exoS* *exoY* از سودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران بیمارستان های تهران با روش Multiplex-PCR

مریم مهدوی^۱، تقی زهرایی صالحی^۲، کیومرث امینی^۱، پریسا مبصری^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن گرم منفی است که باعث انواع عفونت های جدی عمدتاً در بیماران نقص ایمنی می شود. جهت افزایش شدت بیماری، سودوموناس از یک نوع سیستم ترشحی نوع سه برای تزریق پروتئین افکتور سمی به سیتوپلاسم سلول های یوکاریوتی استفاده می کند. چهار پروتئین افکتور در سودوموناس شرح داده شده است: *ExoU*, *ExoS*, *ExoT*, *ExoY*. هدف از این مطالعه بررسی شیوع ژن های کد کننده توکسین سیستم ترشحی نوع سه میان جدایه های سودوموناس جمع آوری شده از نمونه های بالینی مختلف مانند ادرار، زخم، خون و ترشحات تنفسی بیماران بود.

مواد و روش کار: ۵۵ جدایه سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در تهران در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۴ با استفاده از آزمون میکروبیولوژی متداول مشخص شدند. حساسیت جدایه ها به آنتی بیوتیک ها با استفاده از آزمون دیسک دیفیوژن بررسی شد. پس از استخراج DNA، PCR چندگانه در جدایه های سودوموناس برای تشخیص ژن های کد کننده توکسین ترشحی انجام شد.

یافته ها: میزان مقاومت بالا برای سفپیم (۸۹٪)، سفتازیدیم (۸۵/۴۵٪)، آزترونام (۸۳/۶۳٪)، توبرامایسین (۷۸/۱۸٪) و جنتامایسین (۶۰٪) مشاهده شد. شیوع ژن ها در میان تمام نمونه های جداشده به شرح زیر بود: *exoT* (۷۶/۲۲٪)، *exoS* (۳۰/۹۰٪)، *exoY* (۱۴/۵۴٪) و *exoU* (۲۷/۲۷٪) در میان گونه های MDR نسبت به بخش غیر MDR بالاتر (۸۱/۳٪ در مقابل ۱۶/۶٪) بود. جدایه های *exoU*⁺ مقاوم به فلوروکینولون نسبت به نمونه های *exoS*⁺ مقاوم به فلوروکینولون (۳۲٪ در مقابل ۱۷٪) بود.

نتیجه گیری: ژن های کد کننده سیستم ترشحی نوع سه موجود در جدایه های سودوموناس، که در آن ژن های *exoU*، *exoT* و *exoS* در اغلب جدایه ها شناسایی شد در حالی که ژن *exoY* در تعداد کمی از سویه ها تشخیص داده شد.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، سیستم ترشحی نوع سه، PCR چندگانه

کپی رایت © حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۲۹
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۳
انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۶
موضوع:

میکروبی شناسی مولکولی
IJMM 1396; 11(1): 09-17

نویسنده مسئول:
تقی زهرایی صالحی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۱۵۹۷۰۶۷

پست الکترونیک:
tsalehi@ut.ac.ir

مقدمه

عفونت سودوموناس با توجه به مقاومت ذاتی در باکتری به آنتی بیوتیک های معمولاً استفاده شده محدود هستند و مقاومت چند دارویی را افزایش می دهد. استفاده بیش از یک نوع آنتی بیوتیک شناخته شده که برای بیماران خاص مؤثر است؛ استفاده ترکیبی از حداقل دو دارو نشان داده شده یک هم افزایی و یا اثر افزوده در کاهش خطر ابتلا به دریافت یک درمان تجربی نامناسب و برای جلوگیری از ظهور ارگانیزم های مقاوم دارد (۴).

سودوموناس آئروژینوزا نشان دهنده یک علت شایع عفونت های بیمارستانی است. بیماران دچار نقص ایمنی مانند افراد با بدخیمی یا نوتروپنی در معرض خطر بالای باکتری می باشد و سودوموناس یکی از پاتوژن های متداول جداشده در ارتباط با باکتری در چنین بیماران است (۱،۲). باوجود پیشرفت در درمان ضد میکروبی، عفونت سودوموناس همراه با مرگومیر بالا از ۶۱٪ - ۱۸٪ باقی می ماند (۳). انتخاب های درمانی برای

سلول‌های یوکاریوتی را افزایش می‌دهد و باعث گرد شدن انواع سلول‌های خاص می‌شود. جالب‌توجه است، ژن‌های کد کننده برخی پروتئین‌های افکتور نوع سه سودوموناس صفات متغیر هستند. توزیع این ژن‌ها در میان سویه‌های بالینی سودوموناس *آئروژینوزا* باید به روشنی مشخص شود. علاوه بر این، شیوع ژن افکتور در جمعیت‌های جدا شده از سایت‌های بیماری‌های مختلف به‌طور سیستماتیک و کامل کاوش نشده است (۹).

با توجه به اهمیت باکتری سودوموناس در عفونت‌های بیمارستانی شناسایی هرچه بیشتر فاکتورهای ویروانس مرتبط با این بیماری‌ها می‌تواند به توسعه راه‌های مناسب‌تر برای کنترل عفونت‌های ناشی از آن کمک نماید. با توجه به اینکه پروتئین‌های ترشحی نوع سه با حدت باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا*، *شیگلا*، *یرسینیا* مرتبط هستند، این پروتئین‌ها ممکن است نقش مهمی در حدت سودوموناس *آئروژینوزا* در عفونت انسانی داشته باشند. از آنجاکه یک ارتباط بین پروتئین ترشحی نوع سه با مرگ‌ومیر در بیماران آلوده به سودوموناس *آئروژینوزا* وجود دارد، شناسایی پروتئین ترشحی نوع سه در جدایه‌های بالینی سودوموناس *آئروژینوزا* ممکن است در تعیین پیش‌آگهی بیماران مفید باشد. پروتئین سیستم ترشحی نوع سه به نظر می‌رسد بخشی از حدت مضاعف است و عفونت با این سویه‌ها بیماران را در معرض خطر بالاتری نسبت به مرگ‌ومیر قرار می‌دهد.

این مطالعه باهدف بررسی پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میزان شیوع ژن‌های کد کننده توکسین ترشحی تیپ سه در میان جدایه‌های سودوموناس بیمارستانی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی-توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از فرمول $n = \frac{z^2 P(1-P)}{d^2}$ و خطای قابل‌قبول ۰/۰۵ محاسبه گردید. به‌منظور جداسازی باکتری سودوموناس *آئروژینوزا* در مجموع ۱۵۰ نمونه از منابع بالینی مختلف مانند ادرار، زخم، خون و ترشحات تنفسی در سال ۱۳۹۴ از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک کانکی MacConkey، اتوزین متیلن بلو EMB آگار کشت داده شد و پس از آنکوباسیون در دمای ۳۷°C به مدت یک شبانه‌روز، از نظر رشد باکتری و تشکیل کلنی مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌ها بر اساس رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز، حرکت سولفید اندول (SIM)، متیل

برخی از مطالعات گزارش دادند که یک درمان ترکیبی در بیماران با باکتری گرم منفی از تک درمانی نتایج بهتری دارد (۵،۶). عوامل حدت سودوموناس *آئروژینوزا* چند فاکتوری و همراه با سلول نسبت داده شده است عواملی مانند آلژینات، تاژک، لیپوپلی ساکارد، چسبندگی پیلی و غیر پیلی و همچنین با آگزوانزیم‌ها یا عوامل بیماری‌زا ترشحي مانند الاستاز، پروتئاز، پیوسیانین، فسفولیپاز، آگزوتوکسین A، آگزوانزیم S، آگزوانزیم U، پروتئین بیوزنر فیمبریه PilB، همولیزین، نورآمینیداز و سیدروفورها (۷،۸). عامل بیماری‌زا مهم و به‌تازگی شناخته شده سودوموناس *آئروژینوزا* سیستم ترشحی نوع سه است. ژن‌های کد کننده ماشین ترشحی، انتقال و تنظیمی از این سیستم‌ها باهم در منطقه ۵۵ دقیقه از خوشه کروموزوم سودوموناس *آئروژینوزا* تعیین شده‌اند ژن EXS، PCR، PSC طراحی شده‌اند. در مقابل ژن‌های دسته‌بندی شده کد کننده ماشین ترانسپورت نوع سه، ژن‌های کد کننده پروتئین‌های افکتور نوع سه به نظر می‌رسد در سراسر کروموزوم پراکنده شده‌اند. تاکنون چهار پروتئین افکتور شناخته شده: ExoS، ExoY و ExoU، ExoT، ExoS، ExoU دارای دو دمین عملکردی مجزا می‌باشد. پایانه آمین شامل یک دمین فعال کننده GTPase برای Rho GTPases و در نتیجه اختلال در میکروفیلانمنت اکتین و در نتیجه گرد کردن سلول می‌باشد. پایانه کربوکسیل دارای فعالیت ADP ریبوزیل ترانسفراز در جهت Ras و سایر پروتئین‌ها است و برای سلول‌های یوکاریوتی سیتوتوکسیک است. علاوه بر این، ExoS ممکن است نقشی در تعدیل ورود باکتریایی توسط سلول‌های یوکاریوتی بازی کند. ExoT همچنین یک ADP ریبوزیل ترانسفراز می‌باشد با این تفاوت که تنها ۰/۲٪ از فعالیت کاتالیزوری ExoS را دارد. همانند ExoS، آن یک پروتئین فعال کننده GTPase برای Rho GTPases و ورود باکتریایی توسط سلول‌های یوکاریوتی را مهار می‌کند. اگرچه مکانیسم فعالیت پروتئین افکتور سوم، ExoU، نامشخص است، مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که این فاکتور در بیماری بسیار مهم است. ExoU واسطه کشته شدن انواع متفاوت سلول‌های پستانداران در شرایط آزمایشگاهی، از جمله ماکروفاژها، سلول‌های اپی تلیال و فیبروبلاست است. علاوه بر این، موتانت‌های ایزوژنیک که ExoU را تولید یا ترشح نمی‌کنند ناقص در حدت در مدل موش پنومونی هستند. برخلاف سویه نوع وحشی، یک موتانت ایزوژنیک معیوب در ترشح ExoU و ExoT باعث سپس در مدل خرگوش پنومونی نمی‌شود. افکتور چهارم، ExoY، یک آدنیلات سیکلاز است که سطح cAMP داخل سلولی در

مدت ۳-۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از آن در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ تا شسته شود.

آزمون حساسیت آنتی بیوتیک در محیط مولر هینتون آگار مطابق دستورالعمل (۲۰۱۱) CLSI مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده شامل سفنازیدیم (۳۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، توبرامایسین (۱۰ μg)، پیپراسیلین (۱۰۰ μg)، آمیکاسین (۳۰ μg)، آزترونام (۳۰ μg)، سفپیم (۳۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، ایمپنم (۱۰ μg)، پیپراسیلین-تازوباکتام (۱۰-۱۰۰ μg)، تیکارسیلین (۷۵ μg) (MAST, UK) بودند. سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 به عنوان سویه کنترل استفاده شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago) و روش آماری مجذور کای بررسی شدند. واکنش PCR در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این حجم، ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش (Master Mix) تهیه شده از شرکت سینا ژن به همراه ۴ میکرولیتر از مجموع پرایمرها با یک میکرولیتر از DNA الگو و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR با ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه Gel Document (USA, Bio Rad) بررسی شد. سودوموناس آئروژینوزا PAO1 دارای ژن های *exoY*، *exoT*، *exoU*، *exoS* به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. داده های آماری با نرم افزار SPSS نسخه (version 19) و با استفاده از آزمون های آماری توصیفی t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جدول ۱ مشخصات پرایمرها و جدول ۲ برنامه دستگاه ترموسایکلر (Germany, Eppendorf) جهت تکثیر ژن های اگزوتوکسین در این مطالعه را نشان می دهد (۱۱).

رد (MR)، وگس پروسکوئر (VP)، تریپل شوگر آبرون آگار (TSI)، سیمون سترات آگار (SiMc)، اورنیتین دکربوکسیلاز (OD)، لیزین دکربوکسیلاز (LD)، آرژینین دهیدروژناز (AD)، اکسیداسیون فرماتاسیون گلوکز (Merck، آلمان) مورد شناسایی قرار گرفته و در نهایت ۵۵ جدایه شناسایی گردید.

استخراج DNA نمونه ها با استفاده از کیت سیناژن صورت گرفت. این کیت شامل Wash, Lysis, Ributinas, Prelysis buffer و Elution Buffer می باشد. در میکروتیوب سوسپانسیون باکتری با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ، سپس مخلوط ۱۰ μL از محلول Prelysis و ۱۰۰ μL از Ributinas به آن اضافه و در ۵۵°C به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. به ۱۰۰ μL از نمونه ۴۰۰ μL محلول بافر Lysis اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس سپس ۳۰۰ μL محلول پرسپیانتاسیون اضافه و به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد. محتویات میکروتیوب را به میکروتیوب های Spin column منتقل نموده و پیت گردید. تیوب در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ و ۴۰۰ μL محلول Wash buffer I اضافه و به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ و مجدداً به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ و مایع زیرین خارج شد. مجدداً به Spin column به میزان ۴۰۰ μL از Wash buffer II اضافه و در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ و مایع زیرین دور ریخته شد. مجدداً با محلول شستشو II به میزان ۴۰۰ μL شستشو داده و در دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ و مایع زیرین دور ریخته شد. Spin column در تیوب قرار داده و در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ستون Spin را به میکروتیوب های جدید منتقل و ۵۰ μL از محلول Elusion بافر گرم شده در ۶۵°C به ستون اضافه و در ۶۵°C به

جدول ۱: مشخصات پرایمرها جهت تکثیر ژن های اگزوتوکسین جدایه های سودوموناس آئروژینوزا

منبع	توالی DNA پرایمر	طول قطعه bp	ژن تکثیر یافته
۱۱	F, (5'-GCG AGG TCA GCA GAG TAT CG-3') R, (5'-TTC GGC GTC ACT GTG GAT GC-3')	۱۱۸	<i>exo S</i>
۱۱	F, (5'-AAT CGC CGT CCA ACT GCA TGC G-3') R, (5'-TGT TCG CCG AGG TAC TGC TC-3')	۱۵۲	<i>exo T</i>
۱۱	F, (5'-CCG TTG TGG TGC CGT TGA AG-3') R, (5'-CCA GAT GTT CAC CGA CTC GC-3')	۱۳۴	<i>exo U</i>
۱۱	F, (5'-CGG ATT CTA TGG CAG GGA GG-3') R, (5'-GCC CTT GAT GCA CTC GAC CA-3')	۲۸۹	<i>exo Y</i>

جدول ۲: برنامه دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن های اگزوتوکسین جدایه های سودوموناس آئروژینوزا

دنا تورا سیون اولیه	دنا تورا سیون	اتصال پرایمر	گسترش	تعداد سیکل	گسترش نهایی
۹۴°C - ۳ دقیقه	۹۴°C - ۴۰ ثانیه	۵۸°C - ۴۰ ثانیه	۶۸°C - ۱ دقیقه	۳۶	۶۸°C - ۷ دقیقه

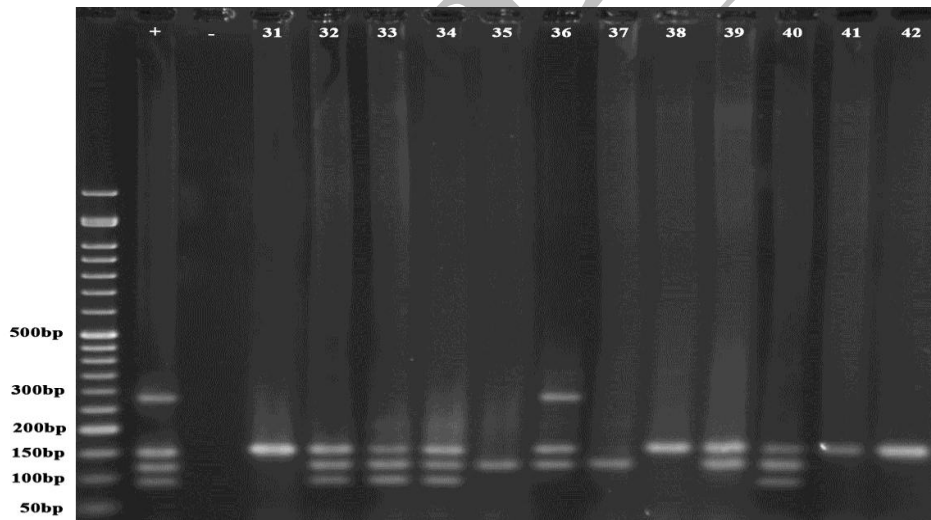
یافته‌ها

نتایج حاصل از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به صورت سفنازیدیم ۴۷ (۸۵/۴۵٪)، جنتامایسین ۳۳ (۶۰٪)، تویرامایسین ۴۳ (۷۸/۱۸٪)، پیراسیلین ۲۶ (۴۷/۲۷٪)، آمیکاسین ۲۷ (۴۹/۰۹٪)، آزترونام ۴۶ (۸۳/۶۳٪)، سفپیم ۴۹ (۸۹/۰۹٪)، سیپروفلوکساسین ۱۶ (۲۹/۰۹٪)، ایمی‌پنم ۹ (۱۶/۳۶٪)، پیراسیلین-تازوباکتام ۶ (۱۰/۹۰٪)، تیکارسیلین ۲۱ (۳۸/۱۸٪) مشاهده گردید. نتایج حاصل از واکنش ژل الکتروفورز ژن‌های *exoS*، *exoU*، *exoY* در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان شیوع ژن‌های *exoS* ۱۷ (۳۰/۹۰٪)، *exoT* ۴۲ (۷۶/۳۶٪)، *exoU* ۳۷ (۶۷/۲۷٪)، *exoY* ۸ (۱۴/۵۴٪) بود. ۴۳ گونه MDR (Multi Drug Resistance) دارای الگوی مقاومتی به ۲ یا بیشتر از دو نوع از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده و ۱۲ گونه غیر MDR یافت شد. ۳۵ جدایه از سویه‌های MDR و ۲ جدایه از سویه‌های غیر MDR حاوی ژن *exoU* هم‌چنین ۱۲ جدایه *exoU*⁺ و ۳ جدایه *exoS*⁺ به فلوروکینولون مقاوم بودند. هر ۴ ژن

به‌طور هم‌زمان در ۳ نمونه، ژن‌های *exoS-exoU-exoT* در ۱۴ نمونه ژن‌های *exoT-exoY-exoU* در ۲ نمونه، *exoU-exoT* در ۶ نمونه، *exoY-exoT* در ۳ نمونه و ژن‌های *exoS* و *exoU* به‌طور هم‌زمان در ۱۷ جدایه (۳۰/۹۰٪) مشاهده گردید. جدول ۳ فراوانی ژن‌های کد کننده توکسین ترش‌چی نوع سه برحسب درصد و تعداد را نشان می‌دهد.

جدول ۳: فراوانی ژن‌های کد کننده توکسین ترش‌چی نوع سه برحسب درصد و تعداد

ژن	تعداد	درصد
<i>exoY-exoS-exoU-exoT</i>	۳	۵/۴۵
<i>exoS-exoU-exoT</i>	۱۴	۲۵/۴۵
<i>exoU-exoY-exoT</i>	۲	۳/۶۳
<i>exoU-exoT</i>	۶	۱۰/۹۰
<i>exoY-exoT</i>	۳	۵/۴۵



شکل ۱: نتایج ژل الکتروفورز ژن‌های *exoS*، *exoU*، *exoY*، *exoT*، *exoU*، *exoY*، *exoT*، *exoS* (۱۱۸bp) کنترل مثبت، ستون - کنترل منفی، ستون ۳۱-۴۲ جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا *exoT* (۱۵۲ bp)، *exoY* (۲۸۹bp)، *exoU* (۱۳۴ bp) M مارکر ۵۰ bp، ستون + محصول PCR ژن‌های *exoY* (۲۸۹bp)، *exoT* (۱۵۲ bp).

بحث

سودوموناس آئروژینوزا، پیشرو پاتوژن‌های گرم منفی عامل عفونت بیشترین توجه را دریافت کرده است. به‌ندرت بافت‌های سالم را آلوده می‌کند، اما زمانی که دفاع به خطر بیافتد، می‌تواند تقریباً تمام بافت‌ها را آلوده کند. آن دارای ظرفیت برای تطابق راحت به تغییر در محیط‌زیست، نیاز غذایی حداقل برای رشد،

سرعت در توسعه مقاومت به آنتی‌بیوتیک و تولید منابع حدت است. بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا به نظر می‌رسد در درجه اول به مجموعه سم آن مربوط می‌شود. در باکتری‌های گرم منفی سیستم ترشح نوع سه شناخته شده که در آن سموم به‌طور مستقیم به سلول‌های میزبان مجاور تزریق می‌شوند (۱۲). سودوموناس چهار پروتئین افکتور شناخته شده از طریق سیستم

ترشحي نوع سه ترشح می‌کند: *exoS*، *exoT*، *exoU* و *exoY* این پروتئين‌ها اعمال سلول ميزبان که در سازمان‌بندی اسکلت سلولی و انتقال سیگنال مهم هستند تعديل می‌کند (۱۳).

در مطالعه‌ای توسط Aghamiri و همکاران حساسیت آنتی‌بیوتیکی از ۲۱۲ جدایه در روش دیسک دیفیوژن مقاومت به جنتامایسین (۵۱٪)، تتراسیکلین (۸۶٪)، سفوتاکسیم (۶۲٪)، تیکارسیلین (۶۰٪) و پيپراسیلین (۵۴٪) نشان دادند (۱۴). در مطالعه‌ای توسط Ahmadi و همکاران بالاترین سطح از مقاومت سویه‌ها را در برابر آمپی‌سیلین (۹۳٪)، جنتامایسین (۸۹/۵٪)، سیپروفلوکساسین (۸۲/۵٪) و آمیکاسین (۷۷/۳٪) و همچنین پایین‌ترین سطح مقاومت در برابر مروپنم (۲/۳٪)، ایمپنم (۲/۹٪) یافتند (۱۵)، که علت عدم تطابق نتایج آنان با یافته‌های حاضر می‌تواند به علت تفاوت در رژیم آنتی‌بیوتیکی، حضور سوش‌های مقاوم متفاوت در بیمارستان و تفاوت بهداشت در مکان‌های مختلف باشد.

در مجموع ۵۵ جدایه سودوموناس به‌دست‌آمده از منابع بالینی با روش PCR در مطالعات مولکولی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که به‌طور کلی، (۳۰/۹۰٪) از نمونه‌ها مورد بررسی حاوی ژن *exoS* بودند. نتایج در توافق با نتایج به‌دست‌آمده توسط Finlayson و Brown بود که گزارش دادند (۵۱٪) از سودوموناس‌های جدا شده از انواع منابع بالینی حاوی این توکسین نمی‌باشد (۱۶). در بررسی کلی نسبت سویه‌های حامل ژن *T3SS* مشخص شد که ژن *exoS* مشترک بود (۱۷). Aghaei و همکاران فراوانی ژن *exoS* را (۳۹/۱٪) از نمونه‌های ادرار، خون و سوختگی سودوموناس نشان دادند (۱۸). Khoramrooz و همکاران اشاره کردند (۳۵/۷٪) از نمونه‌های کلینیکی سودوموناس جدا شده از زخم سوختگی شامل ژن *exoS* بودند (۱۹). Feltman و همکاران *exoS* را در تمام سویه‌های بالینی نیافتند. این نتایج در توافق با گزارش‌های قبلی است که پیشنهاد کرده بودند ژن *exoS* در تمام سویه‌های بالینی سودوموناس *آئروژینوزا* وجود ندارد. بالین‌حال، برآورد شیوع واقعی این ژن یا تولید *ExoS* به‌طور قابل‌توجهی متفاوت است (۹). Fleiszig و همکاران اشاره کردند که تنها ۲ از ۱۰ (۲۰٪) جدایه قرنیه شامل ژن *exoS* بودند، باوجود آنکه روشن نیست این جدایه‌ها به‌صورت تصادفی و یا برای برخی از صفات فنوتیپی انتخاب شدند (۲۰). نتایج متناقض از این مطالعات ممکن است به علت تفاوت در منابع جدایه‌ها، تعداد نمونه گرفته‌شده یا ناتوانی سنجش برای افتراق ژن یا پروتئين *ExoS* از ژن یا

پروتئين *ExoT* باشد. نتایج نشان می‌دهد که همه جدایه‌ها توانایی تولید *exoS* را ندارند (۹). Roy-Burman و همکاران فنوتیپ *exoS* را در ۳۰ نمونه (۲۸٪) در سویه‌های جدا شده از بیماران حاد آلوده بدون CF و گونه‌های به‌دست‌آمده از بیماران با عفونت‌های مزمن CF شناسایی کرد (۲۱).

نتایج نشان می‌دهد که (۱۴/۵۴٪) از نمونه‌ها دارای ژن *exoY* بودند. دیگر محققان گزارش داد که بسیاری از سویه‌های بالینی سودوموناس این ژن را داشتند (۹). Winstanley و همکاران اشاره کردند که (۸۱٪) از نمونه‌های قرنیه مورد بررسی شامل این توکسین بودند (۱۷). Aghaei و همکاران فراوانی ژن *exoY* را (۲۹/۹٪) از جدایه‌های سودوموناس اثبات کردند (۱۸). نتایج Feltman و همکاران نشان داد ۱۰۲ (۸۹٪) از ۱۱۵ جدایه مورد بررسی حاوی *exoY* بودند. جالب‌توجه است، یک تفاوت شاخص بین شیوع ژن *exoY* در جدایه ادراری (۷۰٪) و جدایه نای و یا زیست‌محیطی (۹۵٪) وجود دارد. جدایه‌های ادراری یک کاهش شیوع ژن *exoY* را نشان دادند. علت این تفاوت نامشخص است (۹).

شیوع نسبتاً بالای (۷۶/۳۶٪) ژن *exoT* در میان جدایه‌های سودوموناس در این مطالعه دیده شد. Hauser (۲۰۰۹) اظهار داشت که ژن *exoT* در ۹۱-۱۰۰٪ از نمونه‌های بالینی گرفته‌شده از عفونت‌های حاد حضور داشت (۲۲). علاوه بر این، Feltman و همکاران و Fleiszig و همکاران اشاره کردند که ژن *exoT* در تمام جدایه‌های سودوموناس (بالینی و محیطی) یافت شد، نشان می‌دهد که این ژن صفت متغیر است نیست (۹،۲۰). Burman - Roy و همکاران فنوتیپ *exoT* را در ۳۸ (۳۵٪) را نشان دادند (۲۱). در مطالعه Aghaei و همکاران (۳۷/۹٪) جدایه‌های سودوموناس حامل ژن *exoT* بودند (۱۸). Bradbury و همکاران گزارش دادند که تعداد کمی از جدایه‌های سودوموناس حذف برخی از ژن‌های عامل بیماری‌زایی خاص تست‌شده از جمله ژن *exoT* را نشان دادند (۲۳).

ژن *exoU* کننده برای اگزوتوکسین *exoU* در (۶۷/۲۷٪) از میان جدایه‌های سودوموناس یافت شدند. این نتیجه در تناقض با نتایجی که توسط Wong-Beringer و همکاران گزارش شده می‌باشد که نشان دادند که این ژن برای (۲۷٪) در جدایه سودوموناس اختصاص داشت (۲۴). شیوع جدایه‌های *exoU*⁺ با توجه به منشأ متفاوت بود، ۳۰٪ از نمونه‌های خلط، در مقایسه با ۶۰٪ از نمونه‌های زخم، برای *exoU* مثبت بود. این مشاهدات با

نشان می‌دهد که تمام سودوموناس جدا شده حداقل حاوی یکی از ژن‌های ترشحی نوع سه بودند. ژن *exoT* شایع‌ترین و پس از آن *exoU* در ژن‌های ترشحی نوع سه در جدایه‌های مورد بررسی بود. *ExoS* و *ExoT* هر دو آنزیم‌های ADP-ریبوزیل ترانسفراز هستند. بررسی کلی نسبت سویه‌های حامل هر یک از این ژن‌های مؤثر TTS نشان می‌دهد که *exoT* شایع‌تر است. Feltman و همکاران شیوع ۷۲٪ و ۲۸٪ برای *exoU* و *exoS*، به ترتیب در میان ۱۱۵ جدایه بالینی و زیست‌محیطی را گزارش دادند (۹). به‌طور کلی سطح شیوع ژن جدایه سودوموناس برای *exoU* و *exoS* به ترتیب ۲۹ (۳۱/۵٪) و ۶۵ (۷۰/۷٪)، بود از جمله دو نمونه که از هر دو ژن برخوردار بودند (۱۷). نویسندگان ارتباط آماری معنی‌داری بین ترشح پروتئین TTS و وجود یا عدم وجود ژن *exoU* و *exoS* گزارش دادند (۲۷). بنابراین، اگرچه غربالگری PCR برای شناسایی ژن‌های TTS مستقیماً به فنوتیپ باکتری ارتباط ندارد، ولی می‌تواند به‌عنوان شاخصی از فنوتیپ احتمالی باشد. تفاوت میزان فراوانی ژن‌ها در مطالعات مختلف می‌تواند به علت محل ایجاد بیماری توسط باکتری و عوامل زمینه‌ای باشد. به نظر می‌رسد که جدایه‌های بیماران حاد آلوده از منظر ژنوتیپی از آن‌هایی که از جدایه‌های عفونت‌های مزمن بیماران CF متفاوت‌اند. محققان دیگر حضور ژنوتیپ‌های متفاوت سودوموناس در جدایه‌های بیماران CF گزارش کرده‌اند. ژنوتیپ *exoU⁺exoS⁺* با عفونت مزمن در بیماران CF همراه است، در حالی که ژنوتیپ *exoU⁺exoS⁻* با باکتری جدا شده از خون مرتبط است (۲۵).

یکی دیگر از موضوعات مهم در بیولوژی سودوموناس *آئروژینوزا* که به‌تازگی ظهور یافته ارتباط مقاومت آنتی‌بیوتیکی با ژنوتیپ حدت TTSS است. در مطالعه حاضر *exoU* در میان گونه‌های MDR نسبت به بخش غیر MDR بالاتر (۸۱/۳٪ در مقابل ۱۶/۶٪) بود. Mitov و همکارانش پروفایل مقاومت ضد میکروبی ۲۰۲ جدایه از بیماران CF (تعداد = ۴۲) و غیر CF در بیماران (تعداد = ۱۶۰) تجزیه و تحلیل کردند. نویسندگان یافتند که شیوع *exoS* و *exoU* ۶۲/۴ و ۳۰/۲٪ و *exoU* در میان گونه‌های MDR نسبت به بخش غیر MDR بالاتر (۴۰/۲٪ در مقابل ۱۷/۷٪) بود (۲۸). Garey و همکارانش گزارش دادند که ۹۷/۵٪ از جدایه‌های جریان خون حامل ژن *exoU* همراه با *exoS* و *exoS* شایع‌ترین (۷۰/۵٪) بود (۲۹). میزان مقاومت به چند دارو در سویه‌های *exoU* مثبت در مقایسه با سویه *exoS* مثبت بیشتر بود. جدایه‌های حاوی ژن *exoU* به‌طور قابل توجهی به کلاس‌های

مطالعات قبلی موافق بود، که در آن ۲۵-۳۰٪ از نمونه‌های تنفسی حامل *exoU* بودند، در حالی که بیشتر جدایه‌های بالینی حامل *exoS* نسبت به *exoU* بودند (۲۴). Feltman و همکاران نشان دادند شیوع *exoU* از ۴۰٪ در جدایه‌های زخم و خون، ۳۵٪ در جدایه‌های ادراری، ۲۵٪ در جدایه‌های داخل ریوی و ۱۰٪ در جدایه‌های تنفسی CF متفاوت بود. در مقایسه ۲۰٪ از نمونه‌های زیست‌محیطی حاوی این ژن بودند (۹). Allewelt و همکاران ژن *exoU* در ۹ (۶۴٪) از ۱۴ جدایه باکتریی شناسایی کردند. ممکن است این سویه‌ها به‌طور تصادفی انتخاب نشده باشند و یا جدایه‌های باکتریی از بیماران مبتلا به شرایط بالینی مختلف (برای مثال بیماران نوتروپنی مبتلا به سرطان در مقابل بیماران سوختگی) حاوی جدایه‌های سودوموناس با ژنوتیپ‌های جمعیت مختلف باشد. Fleiszig و همکارانش ژن *exoU* را در ۸ مورد (۸۰٪) از ۱۰ جدایه قرنیه شناسایی کردند، اگرچه مشخص نیست که آیا این جدایه‌ها به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و یا به دلیل مشخصات فنوتیپی انتخاب شده‌اند. جدایه‌های تنفسی CF حاوی ژن *exoU* کمتر و ژن *exoS* بیشتر نسبت به جدایه‌های بدون CF بودند (۹). Jabalameli و همکاران ژنوتیپ TTSS و مقاومت ضد میکروبی در ۹۶ جدایه جمع‌آوری شده از عفونت زخم بیماران سوختگی را تجزیه و تحلیل کردند. بیش از ۹۰٪ از سویه‌ها MDR بودند و ۶۴/۵٪ از آن‌ها حاوی *exoU* در حالی که ۲۹٪ حاوی *exoS* بودند. یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که این ژن‌ها، به‌خصوص *exoU* معمولاً در میان سویه‌های سودوموناس جدا شده از بیماران سوختگی منتشر است (۲۵). این تغییرات *exoU* در سویه‌های بالینی مختلف ممکن است به این علت باشد که جدایه‌ها با منشأ یکسان از بیماران با شرایط بالینی و مدت‌زمان بستری و منابع عفونت مختلف گرفته شده‌اند و این تأیید می‌کند که ژن *exoU* یک صفت متغیر مانند ژن *exoS* است و شیوع متفاوتی در میان سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* دارد.

در مطالعه حاضر ژن‌های *exoU* و *exoS* به‌طور هم‌زمان در ۳۰/۹۰٪ مشاهده گردید. در مطالعه Gawish، تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های زیست‌محیطی و بیمارستانی با توجه به شیوع تمام ژن‌های توکسین ترشحی نوع سه مشاهده نشد (۱۱). جالب توجه است، ژن‌های *exoU* و *exoS* به‌طور تصادفی در بین نمونه‌ها توزیع نشده است. در عوض، یک‌روند به سمت انحصار متقابل بین این دو ژن مشاهده شد که تقریباً هر جدایه که حاوی ژن *exoS* بود حاوی ژن *exoU* نبود و بالعکس همان‌طور که قبلاً در مطالعات مختلف گزارش شده بود (۹، ۲۳، ۲۴، ۲۶). نتایج حاضر

(به عنوان مثال، لووفلوکساسین) قرار می گیرند، در نتیجه ظهور مقاومت بیشتر می شوند (۱۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که تمام سودوموناس آئروژینوزا جدا شده حاوی حداقل یک ژن کد کننده سیستم ترشحی نوع سه بودند. ترکیبی از ژنوتیپ *exoU*⁺ و فنوتیپ مقاوم در برابر فلوروکینولون در جدایه ها نشان داده شده است. سودوموناس آئروژینوزا سیتوتوکسیک و مقاوم در برابر ضد میکروبی یک نگرانی جدی، به ویژه برای بیماران دارای نقص ایمنی است. بنابراین، تشخیص سریع تعیین ژنوتیپ و فنوتیپ جدایه ها مهم است. نظارت بر تعیین شیوع جدایه های سیتوتوکسیک و مقاوم در برابر آنتی بیوتیک جهت کاهش خطر شیوع سودوموناس آئروژینوزا کشنده نیاز است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی پاسارگاد جناب آقای دکتر علیرضا مختاری و مهندس ابوالفضل مقدم به علت همکاری صمیمانه در اجرای این پروژه کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

References

- Papageorghe R. Bloodstream infections in immunocompromised hosts. Roum Arch Microbiol Immunol 2012; 71(2):87-94.
- Samonis G, Vardakas KZ, Maraki S, Tansarli GS, Dimopoulou D, Kofteridis DP, et al. A prospective study of characteristics and outcomes of bacteremia in patients with solid organ or hematologic malignancies. Support Care Cancer 2013; 21(9): 2521-6.
- Bassetti M, Righi E, Viscoli C. *Pseudomonas aeruginosa* serious infections: mono or combination antimicrobial therapy? Curr Med Chem 2008; 15(5): 517-22.
- Van Delden C. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: how should we treat them? Int J Antimicrob Agents 2007; 30(1):71-75.
- Anderson ET, Young LS, Hewitt WL: Antimicrobial synergism in the therapy of gram-negative rod bacteremia. Chemotherapy 1978; 24(1): 45-54.
- Paul M, Benuri-Silbiger I, Soares-Weiser K, Leibovici L. Beta lactam monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside combination therapy for sepsis in immunocompetent patients: systematic review and meta-analysis of randomised trials. BMJ 2004; 328(7441): 668.
- Ra'ooft WM. Distribution of *algD*, *lasB*, *pilB* and *nanI* genes among MDR clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in respect to the site of infection. Tikrit Med J 2011; 17(2): 148-60.
- Rashno Tae S, 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.
- Feltman H, Schuler G, Khan S, et al. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental

- isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol 2001; 147(Pt 10): 2659-2669.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 21th Information Supplement. M100-S21. CLSI, Wayne, PA.
 11. Gawish AA, Mohammed NA, El-Shennawy GA, Mohammed HA. An investigation of type 3 secretion toxins encoding-genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a University Hospital in Egypt. Journal of Microbiology and Infectious Diseases. 2013; 3(3): 116-122.
 12. Saleh RH, Naher HS, Al-Saadi MAK. Molecular Investigation of Type III Secretion System Toxins- Encoding Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Med J Babylon 2012; 9(4): 857-866.
 13. Azimi S, Samadi Kafil H, Bannazadeh Baghi H, Shokrian S, Najaf K, Asgharzadeh M, et al. Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. GMS Hyg Infect Control 2016; 11: Doc04.
 14. Aghamiri S, Amirzozafari N, Fallah Mehrabadi J, Fouladtan B, Samadi Kafil H. Antibiotic Resistance Pattern and Evaluation of Metallo-Beta Lactamase Genes Including bla-IMP and bla-VIM Types in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients in Tehran Hospitals. ISRN Microbiol 2014, Article ID 941507, 6 pages.
 15. Ahmadi K, Hashemian AM, Poryaghobi SM, Akhavan R, Rozmina S, Bolvardi E. Antibiotic Resistance Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Cases of Superficial Infections at the Emergency Unit. Jundishapur J Microbiol 2016; 9(1): e27646. [in Persian]
 16. Finlayson EA, Brown PD. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. West Indian Med J 2011; 60(1): 24-32.
 17. Winstanley C, Kaye SB, Neal TJ, Chilton H J, Miksch S, Anthony HC, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with ulcerative keratitis. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 6): 519-526.
 18. Aghaei SS, Javadi Ali, 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 University of Medical Sciences Journal 2016; 10(1): 48-55. [in Persian]
 19. Khoramrooz SS, Rahbari N, Parhizgari N, Sharifi A, Yazdanpanah M, Gharibpour F, Rabani SM. Frequency of type III Secretion System Cytotoxins - Encoding Genes among *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Burn Patients. Journal of Zanjan University of Medical Sciences and Health Services 2015; 23(99): 52-63. [in Persian]
 20. Fleiszig SMJ, Wiener-Kronish JP, Miyazaki H, Vallas V, Mostov K, Kanada D, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. Infect Immun 1997; 65(2): 579-586.
 21. Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Infect Dis 2001; 183 (12): 1767-1774.
 22. Hauser A. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nat Rev Microbiol 2009; 7(9): 654- 665.
 23. Bradbury RS, Roddam LF, Merritt A, et al. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2010; 59(8): 881- 890.
 24. Wong-Beringer R, Wiener-Kronish J, Lynch S, Flanagan J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolon-susceptible and - resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2008; 14(4): 330-336.
 25. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, P Wiener-Kronish J. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. Crit Care 2014; 18(6): 668.
 26. Lomholt JA, Poulson K, Kilian M. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. Infect Immun 2001; 69(10): 6284-6295.
 27. Berthelot P, Attree I, Plesiat P, Chabert J, de Bentzmann S, Pozzetto B, et al. 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): 512-518.
 28. Mitov I, Strateva T, Markova B. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Brazilian J Microbiol 2010; 41(3):588-595.
 29. Garey KW, Vo QP, Larocco MT, Gentry LO, Tam VH. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. J Chemother 2008; 20(6): 714-720.