Research Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 4 (12-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Molecular analysis of Exotoxin A Associated with Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Patients in Tehran Hospitals

Nour Amir Mozaffari [1], Jalil Falah Mehrabadi [2], Khosro Isazadeh[3], Ali Reza Habibi[3]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. The Lister Institute of Microbiology, Tehran, Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Iran.

Article Information

Article history:
Received:2014/02/14
Accepted:2014/11/21
Available online:2014/11/23

Article Subject:
Nosocomial Infection

IJMM 1393; 8(4): P 36-43

Corresponding author at:
Dr. Ali Reza Habibi

Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Iran.

Email:
Alirh110@gmail.com

Abstract

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is a unique bacteria that in order to survive in different environments by complex adaptation process can make changes in his virulence genes expression and drug resistance. The aim of this research is the investigation of existence of a logical association between *toxA* gene and antibiotic resistance in strains possess the gene.

Materials and Methods: Antibiogram test by disk diffusion method (Kirby Bauer) was performed according to CLSI protocols. In this study, the existence of *toxA* gene with the help of polymerase chain reaction (PCR) in 102 clinical isolates from blood samples, wound, urine and trachea was examined. Chi-square test was used to investigate the relationship between exotoxin A and antibiotic resistance.

Results: The 81 strains (79.4%) had *toxA* gene. Frequency of *toxA* genes in isolated strains from different infections were wound (91.4%), blood (85.7%), trachea (72.7%), and urine (42.1%). Multiple resistance index in strains possess the *toxA* gene was calculated 75%. Chi 2 test to determine the relationship between drug resistance and gene *toxA* was significant ($P<0.05$).

Conclusions: The significant chi-square test and an increase in multi-resistant strains possessing the *toxA* gene, can represent a considerable genetic switch between exotoxin A activity and resistance to antibiotics in the blood, urine, tracheal, wound infections Respectively, which lead to turn genes on of drug resistance regulating in bacteria. The results of this study will be verified by southern blot, analysis of the expression of *toxA* gene and determine the mechanism of resistance in resistant strains Methods.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Exotoxin A, Antibiotic resistance,

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

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. 2014; 8 (4) :36-43

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی مولکولی ارتباط اگزوتوکسین A با مقاومت پادزیستی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهر تهران

نور امیر مظفری ثابت[۱]، جلیل فلاح مهرآبادی[۲]، خسرو عیسی زاده[۳]، علیرضا حبیبی[۳]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۲. آزمایشگاه تخصصی میکروب‌شناسی لیستر، تهران، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۵
پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۳۰
انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۹/۲
موضوع:
عفونت بیمارستانی

IJMM 1393; 8(4): P 36-43

نویسنده مسئول:
علیرضا حبیبی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، ایران

تلفن: ۰۹۱۱۲۳۴۹۳۱۸

پست الکترونیک:
Alirh110@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری منحصر به فرد است که در محیط‌های مختلف، طی یک پروسه سازگاری پیچیده، جهت ادامه حیات، تغییرات مختلفی در بیان ژن‌های ویرولانس و مقاومت دارویی خود ایجاد می‌نماید. هدف این تحقیق بررسی وجود ارتباطی منطقی بین اگزوتوکسین A و مقاومت پادزیستی در سویه‌های واجد این ژن است.

مواد و روش کار: تست آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک (Kirby Bauer) براساس پروتوکل CLSI انجام شد. در این تحقیق، وجود ژن *toxA* به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در ۱۰۲ سویه بالینی از نمونه‌های خون، زخم، ادرار و تراشه مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی ارتباط بین اگزوتوکسین A و مقاومت پادزیستی از آزمون کای ۲ استفاده گردید.

یافته‌ها: ۸۱ سویه (۷۹/٤٪) *toxA*+ بودند. فراوانی ژن *toxA* در سویه‌های جدا شده از عفونت‌های مختلف عبارت بود از زخم (۹۱/٤٪)، خون (۸۵/۷٪)، تراشه (۷۲/۷٪) و ادرار (٤۲/۱٪). شاخص مقاومت چندگانه در سویه‌های واجد ژن *toxA*، ۷۵٪ محاسبه گردید. نتیجه آزمون کای ۲ برای تعیین ارتباط بین مقاومت دارویی و وجود ژن *toxA* معنی‌دار بود ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: مقدار معنی‌داری آزمون کای ۲ و افزایش مقاومت چندگانه در سویه‌های *toxA*+ جدا شده از بیماران بستری، می‌تواند بیانگر سوئیچ ژنتیکی قابل توجه بین فعالیت اگزوتوکسین *A* و مقاومت پادزیستی، به ترتیب در عفونت‌های خون، ادرار، تراشه و زخم باشد که منجر به روشن شدن ژن‌های تنظیم کننده مقاومت دارویی در باکتری می‌گردد. این نتایج با روش‌های ساترن بلات، آنالیز بیان ژن *toxA* و تعیین مکانیسم مقاومت در سویه‌های مقاوم قابل بررسی خواهد بود.

کلمات کلیدی : *سودوموناس آئروژینوزا*، اگزوتوکسین A، مقاومت پادزیستی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی و فرصت‌طلب است که در اغلب بیماران بستری بخصوص بیماران دچار سوختگی شدید، بیماران با نقص سیستم ایمنی، مبتلایان به سیستیک فیبروزیس، بیماران دچار عارضه کاهش غیرطبیعی نوتروفیل‌ها و یا کسانی که مبتلا به HIV هستند، عفونت‌های بسیار شدید و کشنده‌ای ایجاد می‌کند (**۱،۲**).

بیماری‌زایی باکتری به دلیل وجود یک ژنوم بزرگ است که حاوی عوامل ویرولانس متعدد است (**۳،۴**) شیوع بالا، ایجاد عفونت‌های شدید و افزایش مقاومت به پادزیست‌ها از مشخصات و مشکلات اصلی این باکتری در بحث درمان می‌باشد (**۲،۳**).

در *سودوموناس آئروژینوزا*، تنظیم رشد، تولید بیشتر فاکتورهای ویرولانس و مقاومت به عوامل ضد میکروبی مختلف،

تحت کنترل Quorum Sensing (QS) می‌باشد. بیان ژن‌های ویرولانس و ادغام ژن‌های مسئول مقاومت چندگانه (MDR)، توسط پمپ‌های افلوکس و تحت کنترل این فاکتور صورت می-گیرد (۵). مقاومت چندگانه در عفونت‌های با واسطه *سودوموناس آئروژینوزا* منجر به پیامدهای جدی مانند قطع عضو و یا حتی مرگ می‌شود (۶).

سودوموناس آئروژینوزا در برابر سه کلاس اصلی از پادزیست-ها یعنی بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوئوروکینولون‌ها مقاومت نشان می‌دهد (۷). این باکتری با داشتن چهار مکانیسم اصلی شامل نفوذپذیری پایین غشا (۸، ۹)، پمپ‌های افلوکس (۱۰-۱۲)، اصلاح آنزیمی (۹، ۱۳) و مقاومت ناشی از جهش (۱۴) سبب مقاومت به پادزیست‌ها می‌شود. به نظر می‌رسد بعضی از عوامل ویرولانس در مقاومت دارویی باکتری نقش داشته باشد. سویه‌های دارای ژن‌های کد کننده توکسین‌های ویرولانس، به دلیل تولید علائم بالایی از بیماری، بیشتر در معرض پادزیست‌ها قرار داده می‌شوند و درنتیجه سبب افزایش مقاومت به داروهای ضد میکروبی می‌شوند (۱۵). در بین توکسین‌های خارج سلولی، اگزوتوکسن A نقش اصلی را در ویرولانس باکتری دارد؛ اگرچه در مقایسه با توکسین‌های ترشحی نوع III دامنه اثر کمتری دارد (۳).

اگزوتوکسین A (ETA) توسط سیستم ترشحی نوع II، *سودوموناس آئروژینوزا* در فاز رکود و در اثر محدودیت آهن به فضای خارج سلولی ترشح می‌شود (۱۶، ۱۷) این توکسین یک ADP-ریبوزیل ترانسفراز است که همانند توکسین دیفتری از عمل eEF-2 ممانعت کرده و پروتئین‌سازی را در سلول سرکوب می‌نماید و در نتیجه منجر به مرگ سلول می‌شود (۳، ۱۸).

اگزوتوکسن A طی زمان رشد باکتری به صورت عادی و تدریجی تولید نمی‌شود بلکه تابع عوامل مختلف مانند تغییرات درجه حرارت محیط، غلظت آهن و حضور نوکلئوتیدهای خاص مثل اسیدآمینه گلوتامین می‌باشد (۱۹). سمیت موضعی و سیستمیک محتمل‌ترین دلیل برای تولید اگزوتوکسین A می‌باشد (۲۰).

افزایش مقاومت به پادزیست‌ها را می‌توان ناشی از تولید اگزوتوکسین A در فاز رکود دانست، زیرا در این فاز با کمبود مواد غذایی مورد نیاز باکتری مانند آهن، تولید این توکسین آغاز شده (۲۱، ۱۷)، شرایط فیزیولوژیکی باکتری تغییر می‌کند. Kang و همکاران در سال ۲۰۰۳ عدم درمان مناسب عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* را در اثر تأخیر بیش از ۲۴ ساعته در دریافت پادزیست‌های مؤثر بر این باکتری گزارش نموده‌اند. ایشان استفاده از پادزیست‌ها را در مراحل ابتدایی عفونت جهت درمان مؤثر توصیه نموده‌اند (۲۲).

در اثر عمل پمپ‌های افلوکس که پادزیست‌ها را از سلول باکتری خارج می‌کند، اگزوتوکسین‌های سمی (مانند اگزوتوکسین A) نیز از سلول خارج می شوند. این توکسین‌ها با تغییر هدف-های پادزیست‌ها، از تاثیر آنها بر سلول باکتری جلوگیری می کنند. از مهمترین مکانیسم‌های این اگزوتوکسین‌ها، می توان به تنظیم ژن‌های مقاومت و تنظیم برنامه‌ریزی مجدد مسیرهای بیوسنتتیک در باکتری اشاره نمود (۲۳) و در نتیجه سلول باکتری در برابر عوامل ضد میکروبی مقاوم گشته و بقا آن تثبیت می‌شود.

نشان داده شده است که اگزوتوکسین A می تواند سبب کاهش واکنش میزبان به عفونت‌ها گردد (۳)؛ این ویژگی می تواند ضمن تثبیت بقای باکتری و تاخیر در بهبود عفونت، به سایر مکانیسم‌های مقاومت مثل تشکیل غشای نفوذناپذیر و یا پمپ-های افلوکس کمک نماید که در نهایت منجر به مقاومت در برابر پادزیست‌ها می گردد.

هدف از این تحقیق، جداسازی سویه‌های *toxA+* از منابع خون، ادرار، زخم و تراشه، انجام تست آنتی بیوگرام با استفاده از شش پادزیست مهم پیشنهادی CLSI و یک پادزیست خارج از پروتوکل CLSI، تعیین ارتباط بین مقاومت پادزیستی و اگزوتوکسین A و مقایسه فراوانی مقاومت به پادزیست‌ها در سویه‌های *toxA+* و *toxA-* می‌باشد.

نتایج این تحقیق با انجام تست‌های مختلف مانند ساترن بلات، آنالیز بیان *toxA* و تعیین مکانیسم مقاومت در سویه‌های مقاوم قابل بررسی خواهد بود.

مواد و روش ها

نمونه‌های بالینی

در این مطالعه به روش توصیفی-مقطعی، طی ماه‌های شهریور تا بهمن سال ۱۳۹۱، تعداد ۱۰۲ شامل ۱۴ سویه از

عفونت‌های خون، ۵۸ سویه از عفونت‌های زخم، ۱۹ سویه از عفونت‌های ادراری و ۱۱ سویه از عونت‌های تراشه از بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به بیمارستان‌های بقیه‌ا...، رسول اکرم، شریعتی، مطهری، کسری، تهران کودکان، مهر، میلاد و هاشمی نژاد در تهران تحت محیط LB Broth (مرک آلمان) در میکروتیوپ‌های 2ml دریافت گردیدند و بعد از کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند.

تست‌های تشخیصی

برای شناسایی نمونه‌ها از تست‌های رنگ آمیزی گرم، اکسیداز (رشد ایران)، رشد در ۴۲ °C تحت محیط سیتریماید آگار (مرک آلمان) و تخمیر قندها (تحت محیط کشت پایه OF میکرومدیای مجارستان) استفاده شد. به هر میکروتیوپ حاوی محیط LB Broth ۲۰٪ گلیسرول افزوده شد و در دمای ۸۰ °C- نگهداری شد (**۲۴**).

تست آنتی بیوگرام

براساس پروتوکل شماره M100-S17 موسسه CLSI، شش پادزیست مختلف شامل Ceftazidime (30µg), Imipenem(10µg), Aztreonam(30µg), Piperacillin (100µg),, Ciprofloxacin(10µg) Gentamicin (10µg) و نیز Cefotaxime (30µg) انتخاب و به روش انتشار دیسک (Kirby Bauer) در محیط مولر هینتون آگار (میکرومدیا مجارستان) تست فوق مطابق با کدورت استاندارد نیم مک فارلند انجام گرفت. تمام دیسک‌ها بجز آزترئونام (MAST انگلیس) ساخت شرکت پادتن طب ایران بودند.

شناسایی مولکولی ژن *toxA*

به منظور اثبات وجود ژن *toxA* از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده گردید. برای استخراج DNA از کیت مربوطه ساخت شرکت فرمنتاز استفاده شد. جهت طراحی پرایمرهای بالادست و پایین دست، از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، بخشی از ژنوم کامل *سودوموناس آئروژینوزا* سویه *PAO1* انتخاب گردید. سپس با استفاده از نرم افزار Gene Runner پرایمرهای بالا دست و پایین دست ژن فوق طراحی شد و ویژگی‌های مربوطه شامل T_m نوکلئوتیدها، درصد G+C و وضعیت تشکیل لوپ‌های سنجاق سری درون هر یک از پرایمرها بررسی گردید. در نهایت توالی های بالادست و پایین دست پرایمرهای *toxA* به شرح جدول-۱، طراحی و برای سنتز به شرکت ژن فناوران ارسال شدند.

برای انجام واکنش PCR در حجم 50 µl از مواد زیر به میکروتیوبهای 0.5 ml اضافه گردید.: 5 µl بافر استاندارد 10X برای واکنش با آنزیم Taq، 1 µl از هر 200 µM dNTPs، 2 µl مخلوط ۵µM۰. پرایمرها (۱۰ پیکیمول)، 2µl از محلول 0.5 mM MgCL2، 2 µl از DNA الگو (۰/۵ µgr) و 0.25 µl آنزیم 1.25 units Taq DNA polymerase میکروتیوب‌ها بعد از اضافه نمودن 50 µl روغن معدنی و یکنواخت سازی مخلوط، در ترموسایکلر قرار گرفته و آماده واکنش PCR گردیدند.

میکروتیوب‌ها بعد از ایجاد مخلوط یک نواخت با دستگاه Micro-Spin مدل Kingen، برای انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر مدل Bioer XP Cycle ساخت کشور ژاپن قرار داده شدند. دستگاه جهت انجام واکنش با برنامه زمانی 2.21 ساعت و سیکلهای حرارتی به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت: یک سیکل به مدت چهار دقیقه و دمای ۹۴ درجه سلیسیوس (مرحله آغاز)، ۳۵ سیکل به مدت یک دقیقه به ترتیب برای دماهای ۹۴ درجه (واسرشتگی دو رشته)، ۶۲ درجه (اتصال آنزیم و پرایمرها به DNA الگو) و ۷۲ درجه (مرحله طویل شدن زنجیره) و در نهایت یک سیکل به مدت ۵ دقیقه و دمای ۷۲ درجه (طویل شدن نهایی) (**۲۵**). از سویه *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 15692 به عنوان کنترل مثبت (**۲۶**) و از آب مقطر استریل برای کنترل بلانگ استفاده گردید. برای بررسی محصولات PCR از روش ژل الکتروفورز، با استفاده آگارز 0.8٪، 30 ml بافر TBE، 2 µl محلول اتیدیوم بروماید و مارکر 100bp استفاده شد. جهت مشاهده باندهای تشکیل شده، از دستگاه Gel doc مدل Nanolytik ساخت شرکت Precision آلمان استفاده گردید (شکل ۱).

به منظور تخلیص محصول PCR از سایر اجزاء باقیمانده واکنش PCR، از کیت تخلیص DNA، ساخت شرکت فرمنتاز، استفاده شد. محصول تخلیص شده برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. بعد از دریافت منحنی توالی ژن‌های فوق (شکل ۲) و مشاهده آنها از طریق نرم افزار کروماس لیت، خروجی ژنها با فرمت FASTA به نرم افزار CLUSTALW منتقل گردید.

آنالیز آماری

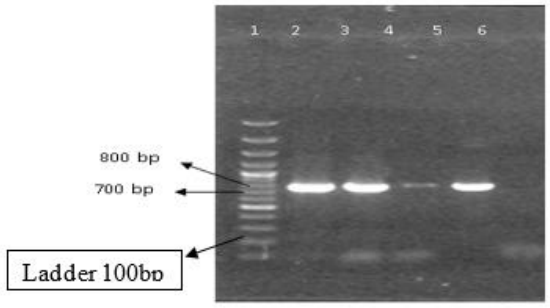
برای بررسی ارتباط مقاومت دارویی باکتری با اگزوتوکسین A از آزمون کای ۲ پیرسون استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمر های مورد استفاده جهت ردیابی ژن toxA مورد مطالعه *سودوموناس آئروژینوزا*

T_m	٪GC	طول توالی	شاخص شروع	توالی '3 – '5	نوع توالی	اندازه ژن
۶۶/۲	۶۶/۷	۱۸	۱۱۳۷	CACAGGCAACGACGAGGC	Forward primer	710 bp
۶۷/۲	۵۲/۴	۱۸	۱۸۴۶	CCTTGTCGGGGATGCTGG	Reverse primer	

یافته ها

آزمایشات بر پایه PCR نشان داد که ۷۹/۴٪ از کل سویه ها (۸۱ سویه) *toxA*+ بودند. همترازی توالی محصولPCR تعیین توالی شده، تطابق آن را با ژن اگزوتوکسین A سویه *ATCC 25619 سودوموناس آئروژینوزا* A (۹۷/۴۹٪ شباهت) موجود در بانک اطلاعات ژنی تایید نمود (شکل ۲).



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن toxA سویه‌های استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ۱(DNA مارکر 100bp. ۲) سویه کنترل مثبت *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 15692 ۵-۳) ایزوله‌های بالینی دارای ژن toxA. ۶ آب مقطر به عنوان کنترل منفی. سویه‌های *toxA*+ در باند ۷۵۰bp مشاهده گردیدند.

در خصوص سویه‌های جدا شده از عفونت خون، از ۱۲ سویه *toxA*+، شش سویه دارای مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها (MDR)بودند. یک سویه به دو پادزیست و پنج سویه دیگر به بیش از پنج پادزیست مقاومت نشان می دادند. افزایش نرخ مقاومت در سویه‌های *toxA*+ در پادزیست‌های پیپراسیلین و آزترئونام (۵۰٪) دیده شد. در این سویه‌ها کمترین مقاومت نسبت به دو پادزیست جنتامایسین و سیپروفلوکسازین (۳۳٪) مشاهده گردید. مقاومت به سفوتاکسیم نیز در اکثر سویه‌ها، با سایر پادزیست‌ها برابر و یا بسیار نزدیک بود. در دو سویه *toxA*، یک سویه به سه پادزیست مقاومت چندگانه نشان می داد و سویه دیگر به تمام پادزیست‌ها حساس بود.

```
------------------------------AGTCACAGGCAACGACG 17
GGCCGCCGCCGAGAGCGAGCGCTTCGTCCGGCAGGGCACCGGCAACGACG 1150
                              .* ***.**********
AGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGACGTGGTGAGCCTGACCTGCCCGGTCGCC 67
AGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGACGTGGTGAGCCTGACCTGCCCGGTCGCC 1200
**************************************************
GCCGGTGAATGCGCGGGCCCGGCGGACAGCGGCGACGCCCTGCTGGAGCG 117
GCCGGTGAATGCGCGGGCCCGGCGGACAGCGGCGACGCCCTGCTGGAGCG 1250
**************************************************
CAACTATCCCACTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGACGGCGGCGACATCAGCT 167
CAACTATCCCACTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGACGGCGGCGACGTCAGCT 1300
*****************************************.******
TCAGCACCCGCGGCACGCAGAACTGGACGGTA------------------ 199
TCAGCACCCGCGGCACGCAGAACTGGACGGTGGAGCGGCTGCTCCAGGCG 1350
*****************************.
```

شکل ۲: مطابقت ژن toxA با ژن اکزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا* *ATCC* 25619

در سویه‌های جدا شده از عفونت تراشه، از بین هشت سویه *toxA*+، پنج سویه به تمام پادزیست‌ها مقاومت چندگانه داشتند. در این سویه‌ها مقاومت به پادزیست‌های پیشنهادی CLSI تفاوتی با سفوتاکسیم نداشت. در این عفونت سه سویه فاقد ژن toxA بودند که دو سویه دارای مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها بودند؛ اما درصد مقاوم در یک سویه بسیار کمتر از سویه دیگر بود (مقاومت به دو پادزیست). یک سویه هم به هیچ پادزیستی مقاوم نبود. مقاومت به پادزیست سفوتاکسیم و آزترئونام به ترتیب ۶۳/۶٪ و ۵۴/۵٪ بالاتر از سایر داروها بود. در سویه‌های *toxA*+، نسبت به سه پادزیست سفتازیدیم، پیپراسیلین و سیپروفلوکساسین کمترین مقاومت مشاهده گردید. در سویه‌های *toxA*- نسبت به ایمی پنم، هیچ گونه مقاومتی مشاهده نگردید، اما دو پادزیست سفوتاکسیم و آزترئونام بیشترین مقاومت را (۶۶/۷٪) به خود اختصاص دادند.

از بین ۱۹ سویه جدا شده از عفونت‌های ادراری، هشت سویه دارای ژن toxA بودند که نیمی از این هشت سویه به حداقل دو پادزیست مقاومت نشان می دادند، اما در ۱۱ سویه *toxA*، تنها سه سویه به پادزیست‌های مورد بررسی مقاومت نشان می دادند، بطوریکه دو سویه فقط به دو پادزیست و سویه دیگر به پنج پادزیست مقاوم بودند. در سویه‌های*toxA+* فقط یک سویه به پیپراسیلین مقاومت نشان می داد و بقیه سویه‌ها نسبت به این دارو حساس بودند. میزان مقاومت در دو پادزیست سفوتاکسیم (۵۰٪) و آزترونام (۶۲/۵٪) بیشترین مقدار را نشان می داد. در سویه‌های *toxA*- نسبت به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین کمترین مقاومت (۹/۱٪) و نسبت به جنتامایسین و پیپراسیلین بیشترین مقاومت مشاهده گردید.

از ۵۳ سویه *toxA*+ در عفونت‌های زخم، ۴۵ سویه به بیش از دو پادزیست مقاومت نشان می دادند. میزان مقاومت چندگانه در ۹۴٪ این سویه‌ها، بیش از سه پادزیست بود. پنج سویه *toxA*+ نیز نسبت به تمام پادزیست‌های مورد بررسی حساس بودند و سه سویه فقط به آزترئونام مقاوم بودند. تمام ۵ سویه *toxA*، به بیش از سه پادزیست مقاوم بودند. مقاومت سویه‌های جدا شده از نمونه‌های زخم به تمام پادزیست‌ها بیش از ۶۵٪ بود و پادزیست-های پیشنهادی CLSI نسبت به سفوتاکسیم ارجحیت چندانی نداشتند.

سویه‌های *toxA*+ جدا شده از بیماران بستری در تمام پادزیست‌های مورد بررسی نسبت به سویه‌های دارای این ژن در بیماران سرپایی افزایش مقاومت بالاتری را نشان می دادند. اوج مقاومت در بیماران بستری در سویه‌های *toxA*+ در سفوتاکسیم (۷۲/۲٪) مشاهده گردید. در سویه‌های *toxA*، میزان مقاومت در سویه‌های جدا شده از بیماران بستری و سرپایی تغییرات چندانی را نشان نمی داد. نکته قابل توجه اینکه روند افزایش مقاومت در سویه‌های *toxA*+ ایزوله شده از بیماران بستری نسبت به بیماران سرپایی در تمام پادزیست‌ها منظم و قابل توجه بود، ولی در سویه‌های *toxA*- در دو محیط بیمارستانی و جامعه توزیع مقاومت بین پادزیست‌ها نامنظم بود.

آزمون کای ۲ برای تعیین ارتباط بین اگزوتوکسین A و پادزیست‌های مورد بررسی معنی دار بود ($P<0.05$)، اما در سویه-های toxA- مقدار آزمون فوق معنی دار نبود ($P>0.05$).

بحث

در این مطالعه ۱۰۲ سویه جدا شده از عفونت‌های کلینیکی از دو جنبه‌ی دارا بودن ژن *toxA* و مقاومت دارویی مورد بررسی قرار گرفته‌اند؛ در حالی که تاکنون مطالعات چندانی از نقش اگزوتوکسین A در مقاومت دارویی این باکتری صورت نگرفته است.

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد توزیع سویه‌های *toxA*+ در عفونت‌های مورد بررسی بسیار قابل ملاحظه است. از میزان توزیع این ژن در عفونت‌های مربوطه می توان به عنوان معیاری برای تشخیص عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده نمود ($P<0.05$). بیشترین فراوانی ژن *toxA* در سویه‌های جدا شده از عفونت زخم بوده است (۹۱/۴٪) که با گزارشات سایر پژوهشگران مطابقت می‌کند. Badr همکاران در سال ۲۰۰۸ فراوانی ژن *toxA* را در عفونت‌های زخم ۸۹٪ اعلام نموده است (**۱۹**)،aslani در سال ۲۰۱۳، فراوانی آن را در این عفونت ۹۰٪ ذکر نموده است (**۲۷**) Chifiriuc در سال 2013، فراوانی آن را در ۱۰۰٪ سویه‌های جدا شده از زخم گزارش نموده است (**۲۸**). Sadeghi fard در سال ۲۰۱۳ فراوانی این ژن را در عفونت فوق ۸۰٪ گزارش نموده است (**۲۸**). Storey در سال 1994 مقدار این ژن را در عفونت‌های خونی متغیر اعلام نموده است (**۳۰**). Hashemi Pouur و همکاران در سال ۲۰۱۰ فراوانی ژن *toxA* را در سویه‌های بدست آمده از عفونت تراشه ۷۷٪ گزارش نموده‌اند (**۳۱**) که به یافته‌های این تحقیق (۷۲/۷٪) نزدیک است. Sharma در سال ۲۰۰۴، فراوانی این ژن را در عفونت‌های ادراری ۱۱٪ اعلام نموده (**۳۲**) است (در این تحقیق ۴۲٪).

در این مطالعه همانند بررسی سایر محققین، مقاومت سویه-های مختلف به پادزیست‌های مورد بررسی، بسته به نوع عفونت متفاوت است؛ بطوریکه در عفونت‌های زخم بیشترین مقاومت و در عفونت‌های ادراری کمترین مقاومت دیده شد. تنوع ژنتیکی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* می تواند علت اصلی تنوع مقاومت به پادزیست‌های مختلف باشد (**۳۳**).

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد درصد مقاومت چندگانه در سویه‌های *toxA*+ ایزوله شده از عفونت‌های خونی نسبت به سویه‌های *toxA*- افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می دهد. با توجه به حساسیت بالای ایزوله‌ها به جنتامایسین (۷۳٪)،

این پادزیست بهترین داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های خونی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* بوده است. در تحقیق Flamm در سال ۲۰۰۴، نیز این پادزیست با حساسیت حدود ۷۵٪ یکی از بهترین داروها در درمان این گونه عفونت‌ها گزارش شده است (**۳۴**)؛ بنابراین در این نوع عفونت‌ها، آمینوگلیکوزیدها داروهای انتخابی مناسبی می توانند باشند. در سویه‌های *toxA*+ نیز می توانیم فلوروکینولون‌هایی مثل سیپروفلوکساسین را جهت درمان به آمینوگلیکوزیدها اضافه نماییم. در مطالعه Kollef در سال ۲۰۰۴ از این دو پادزیست به یکی از بهترین داروهای مورد استفاده در درمان عفونت‌های خونی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا*، اشاره شده است (**۳۵**). افزایش درصد مقاومت در سویه‌های *toxA*+ در برابر سویه‌های *toxA*- بیانگر نقش احتمالی این اگزوتوکسین در مقاومت دارویی باکتری در نمونه‌های خونی می‌باشد.

شاخص‌های آماری نقش مهمتری را برای دخالت اگزوتوکسین A در ایجاد مقاومت پادزیستی در سویه‌های جدا شده از تراشه، نسبت به ایزوله‌های خون تبیین می کنند. با توجه به افزایش مقاومت چندگانه در سویه‌های *toxA*+ نسبت به ایزوله‌های *toxA*- در عفونت‌های تراشه، نقش اگزوتوکسین A به عنوان یک فاکتور ویرولانس موثر در مقاومت باکتری محرز می باشد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد پادزیست‌های سفتازیدیم، پیپراسیلین و سیپروفلوکساسین داروهای مناسبی برای مقابله با عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* می باشند؛ بنابراین برخی از سفالوسپورین‌های نسل سوم، پنی سیلین‌های وسیع الطیف و فلوروکینولون‌ها را می توان در عفونت‌های تنفسی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده نمود.

مقاومت در سویه‌های ادراری نسبت سایر نمونه‌ها در مرتبه پایین‌تری قرار دارد؛ بطوریکه این روند می تواند در مجاری ادراری میزان آلودگی را بسیار کاهش دهد... Sumithraو همکاران در سال ۲۰۱۴ دخالت *سودوموناس آئروژینوزا* را در عفونت‌های ادراری بسیار ضعیف گزارش نموده‌اند و اگزوتوکسین A را در کنار مجموعه‌ای از عوامل ویرولانس مختلف، عامل بروز عفونت‌های ادراری بیان نموده‌اند (**۳۶**). علیرغم کاهش مقاومت در سویه‌های جدا شده از عفونت‌های ادراری نسبت به عفونت‌های دیگر، مقایسه مقاومت در سویه‌های *toxA*+ و *toxA*- نشان می دهد که اگزوتوکسین A در عفونت‌های ادراری نسبت به سویه‌های *toxA*- نقش بیشتری را در ایجاد مقاومت ایفا می‌کند؛ بطوری‌که در سویه‌های *toxA*+، نیمی از سویه‌ها به پادزیست‌های مورد بررسی مقاومت چندگانه نشان می دهند، اما با وجود فراوانی بیشتر سویه‌های *toxA*، مقاومت فقط در دو سویه چندگانه می باشد.

به دلیل مقاومت بالای سویه‌ها به این پادزیست‌ها، هیچ یک از این مواد ضد میکروبی مورد بررسی، به طور کامل بر روی عفونت‌های زخم که در اثر *سودوموناس آئروژینوزا* ایجاد شده اند، موثر نمی باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های جدا شده از نمونه‌های زخم بیشترین مقاومت را به پادزیست‌های مورد بررسی نشان می دهند، اما مقایسه مقاومت پادزیستی در سویه‌های *toxA*+ (۷۳٪) و *toxA*- (۶۷/۷٪) نشان می‌دهد که اگزوتوکسین A در این عفونت‌ها نسبت به سایر عفونت‌ها در ایجاد مقاومت نقش محدودتری را ایفا می‌کند؛ به عبارت دیگر مقاومت بالای باکتری به پادزیست‌ها به دلیل سایر عوامل دخیل در مقاومت می‌باشد و اگزوتوکسین A نقشی کمک کننده مانند تاخیر در بهبود زخم را ایفا می‌کند. Badr همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده است تمام ۳۸ ایزوله *toxA*+ مورد بررسی وی، قابلیت تاخیر در بهبود زخم را دارند، در حالی که در تمام ایزوله‌های فاقد این ژن با استفاده از درمان آنتی‌بیوتیکی، بهبود زخم به طور معمول انجام شده است (**۱۹**).

نتایج این تحقیق نشان داد در تمام عفونت‌های مورد بررسی، سویه‌های تولید کننده اگزوتوکسین A نسبت به سویه‌هایی که فاقد این توانایی هستند، درجات بیشتری از مقاومت را بروز می دهند، اما این نقش اگزوتوکسین A در عفونت‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. بطوریکه دخالت این اگزوتوکسین را می توان به ترتیب در عفونت‌های خون، ادرار، تراشه و زخم حائز اهمیت دانست.

مطالعات قبلی بستری بودن طولانی مدت بیماران و استفاده از داروهای وسیع الطیف را از دلایل اصلی افزایش مقاومت دارویی در بیماران بستری نسبت به بیماران سرپایی ذکر نموده‌اند (**۳۷**). نتایج بدست آمده از این تحقیق با تایید نظرات گذشته، شیبی تند از یک روند افزایش مقاومت چندگانه به پادزیست ها را، در سویه‌های *toxA*+ در بیماران بستری نسبت به بیماران ایزوله شده از جامعه نشان می‌دهد، در حالی که در سویه‌های *toxA*- در دو محیط، روندی نامنظم از مقاومت چندگانه مشاهده می گردد. با

توجه به یافته‌های آماری و مقدار معنی داری کای ۲ ($p<0.05$) نقش اگزوتوکسین A در ایجاد مقاومت پادزیستی در محیط بیمارستان محرز می گردد و این توکسین احتمالاً می تواند به سایر عوامل مقاومت در شرایط بیمارستانی مثل استفاده مکرر از پادزیست‌ها (**۳۸**) و یا تاثیر عوامل میکروبی دیگر مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در ایجاد مقاومت (**۳۹**) کمک نماید. نشان داده شده است وقتی که *سودوموناس آئروژینوزا* و (MRSA) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* در یک بیوفیلم تکثیر می یابند، تولید اگزوتوکسین A به اندازه ۱۸۳۹ با افزایش می یابد (**۴۰**).

این مطالعه نشان داد سویه‌هایی از *سودوموناس آئروژینوزا* که توانایی تولید اگزوتوکسین A را دارند نسبت به داروهایی که بطور معمول از آنها علیه این میکروارگانیسم استفاده می‌شود، درصد بالایی از مقاومت را نشان می دهند(Multiple Antibiotic Resistance: MAR Index=73%). افزایش مقاومت دارویی باکتری در سویه‌های *toxA*+، می تواند یک سوئیچ ژنتیکی قابل توجه را بین فعالیت اگزوتوکسین A و مقاومت به پادزیست‌ها پیشنهاد نماید؛ بطوریکه فعالیت این اگزوپروتئین منجر به روشن شدن ژن‌های تنظیم کننده مقاومت دارویی در باکتری می گردد. این ویژگی اگزوتوکسین A می تواند درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را در بیماران با مشکل مواجه نماید. برای اثبات این سویچ ژنتیکی، استفاده از روش‌های ساترن بلات، آنالیز بیان *toxA* و تعیین مکانیسم مقاومت در سویه‌های مقاوم ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان تحقیق حاضر، از پرسنل آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه مالک اشتر و نیز موسسه میکروبیولوژی لیستر که در انجام تست PCR همکاری نمودند و همچنین از جناب آقای فولادتن و سرکار خانم آقامیر که در جمع آوری نمونه‌های بالینی کمک شایانی کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد

References

1. Finlayson EA, Brown PD. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented Pseudomonas aeruginosa. West Indian Medical Journal. 2011; 60(1): 24-32.
2. Kamel GM, Edeen NAE, Yousef El-Mishad M, Ezzat RF. Susceptibility pattern of Pseudomonas aeruginosa against antimicrobial agents and some plant extracts with focus on its prevalence in different sources. Global Veterinaria. 2011; 6(1): 61-72.
3. Kipnis E, Sawa T,Kronish JW. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Médecine et maladies infectieuses. 2006; 36(University of California San Francisco): 78–91.
4. Lyczaka JB, Cannonb CL, Piera GB. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes and Infection. 2000; 2: 1060-1051.
5. Mansouri S, Norouzi F, Moradi M and Nakhaee N. Comparison of Virulence Factors among Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa Producing and Non-producing Extended Spectrum ~-lactamases. Current Research in Bacteriology. 2011; 4(3) :85-93.
6. Murugan N, Malathi J, Umashankar V, adhavan HNR. Comparative Genomic Analysis of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates VRFPA06 and VRFPA08 with VRFPA07. Genome Announcements. 2014; 2(2): 1-2.
7. Stagljar I, Arnoldo A, Curak J. Identification of small molecule inhibitors of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S using a yeast phenotypic screen. Toronto, Canada; 2008.
8. Yordanov D, Strateva T. Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance. Journal of Medical Microbiology. 2009; 58: 1133-1148.
9. Lambert, PA. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Journal of the Royal Society of Medicine. 2002; 41(95): 22-26.
10. Piddock MA, Webber LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003; 51: 9–11.
11. Tomas M, Doumith M, Warner M. Efflux Pumps, OprD Porin, AmpC B-lactamase, and multiresistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010; 54(5): 2219–2224.
12. Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against Pseudomonas aeruginosa. Libyan J Med. 2011;6.
13. Vaziri F, Peerayeh SN, Behzadian Nejad Q, Farhadian A. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (69)-I, aac (69)-II, ant (20)-I, aph (39)-VI) in Pseudomonas aeruginosa. Clinical Science. 2011; 66(9): 1519-1522.
14. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare? Clinical Infectious Diseases. 2002; 34(1): 634-640.
15. Tokajian S, Timani R, Issa, Araj NG. molecular characterization, multiple drug resistance, and virulence determinants of Pseudomonas aeruginosa isolated from

lebanon. British Microbiology Research Journal. 2012; 2(4): 243-250.
16. Boncompte LF, Chapalain A, Chevalier S. Full virulence of Pseudomonas aeruginosa requires OprF. Infection and Immunity. 2011; 79(3): 1176–1186.
17. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa. PNAS. 2002; 99(10): 7072–7077.
18. Japoni A, Farshad S ,Alborzi A. Pseudomonas aeruginosa: burn infection, treatment and antibacterial resistance. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2009; 11(3): 244-253.
19. Badr RI, Nagdy M, Sabagh A, Bahaa A. Pseudomonas aeruginosa exotoxin A as a virulence factor in burn wound infections. Egyptian Journal of Medical Microbiology. 2008; 17(1): 125-132.
20. Mantengoli E, Rossolini GM. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect. 2005; 11 (4): 17-32.
21. Chevalier S, Bouffartigues E, Gicquel G. The major outer membrane protein oprf is required for rhamnolipid production in Pseudomonas aeruginosa. Bacteriology & Parasitology. 2011; 2: 1-5.
22. Kang C, Kim SH, Kim HB, Park SW. Pseudomonas aeruginosa bacteremia:risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. Clinical Infectious Diseases. 2003; 37: 745–751.
23. Santos PM, Mesquita CS, Castro PS. Pseudomonas aeruginosa: Phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. CBMA – Centre of Molecular and Environmental Biology, Department of Biology, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal; 2013.
24. Aslanzadeh J, Danesh A, Dare D, Bolton G, Cameron MJ, etal. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, Tanged YW and Stratton CW, Nashville: USA, Vanderbilt University Medical Center; 2006.
25. Moller S, McPherson MJ. PCR, Second Edition New York: Taylor & Francis Group; 2006.
26. M L. VASIL, C Chamberlain and CC R. Grant, Molecular Studies of Pseudomonas Exotoxin A Gene. Infection And Immunity. 1986; 52(2): 538-548.
27. Aslani MM, Nikbin VS, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour GH. Molecular identification and detection of virulence genes among Pseudomonas aeruginosa isolated from different infectious origins. Iranian journal Microbiology. 2012; 4(3): 118-123.
28. Chifiriuc MC, Cotar AL, Banu O, Lazar V. Molecular characterization of virulence patterns in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from respiratory and wound samples. Open Access. 2013; 3(2): 551-558.
29. Sadeghifard N, Valadbeigi H,Rafiei Tabatabaei R, Maleki A. A study on the frequency of toxin A, alginate genes, and of clinical Pseudomonas aeruginosa strains. Ilam University of Medical Science. 2012; 20(1): 58-64.
30. Storey DG, Tracy LR, Ujack EE, Rabin HR. Association between transcript levels of the Pseudomonas aeruginosa regA, regB, and toxA genes in sputa of cystic fibrosis patients. Infection and Immunity. 1994; 62(8): 3506-3514.
31. Hashemipour M., Aslani MM, Sadat Nikbin V. Identification of Pseudomonas aeruginosa isolated from respiratory specimens using polymerase chain reaction (PCR) specific outer membrane lipoprotein oprI and oprL genes and exotoxin. Lorestan University of Medical Sciences Journal. 2010; 40(2): 23-29.
32. Sharma S, Kaur R, yadav V. Cntribution of exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa in acut and chronic experimental renal infection. Infection disease. 2004; 57: 119-120.
33. Siqueira VLD, Cardoso RF, Pádua RAF. High genetic diversity among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp. isolated in a public hospital in Brazil. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013; 49(1): 49-56.
34. Flamm RK, Weaver MK, Thornsberry C, Jones ME. Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004; 48(7): 2431–2436.
35. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(4):1306-11.
36. Sumithra A, Vijayalakshmi P, Jegadeeshkumar D. Prevalence, antibiotic resistance patterns and virulence factors of urine isolates of Pseudomonas aeruginosa.
37. Mohanasoundaram, KM. The antimicrobial resistance pattern in the clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care Hospital; 2008–2010 (A 3 year study). Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2011; 5(3):491-4
38. Mandsberg LF, Ciofu O, Kirkby N, Christiansen LE, Poulsen HE,Høiby N. antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009; 53(6): 2483–2491.
39. Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, Patel SB, Chen J, Valdes J, et al. Interactions of methicillin resistant Staphylococcus aureus USA300 and Pseudomonas aeruginosa in polymicrobial wound infection. PLoS One. 2013;8(2):e56846.
40. Goldsworthy MJH. Gene expression of Pseudomonas aeruginosa and MRSA within a catheter-associated urinary tract infection biofilm model. Bioscience Horizons. 2008;1(1):28-37.