مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره بیست و نهم - زمستان ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه وجود فاکتورهای ویرولانس(الاستاز و فسفولیپاز)وتعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا جداشده از نمونه‌های بالینی

محیا رهبر زارع، فاطمه نوربخش*، سحر هنرمند جهرمی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین،ایران

چکیده

سابقه و هدف:

سودوموناس آئروژینوزا یکی از پاتوژن‌های مهم در ایجاد عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان در سراسر جهان می‌باشد. این باکتری دارای ژن-های ویرولانس متعددی است که در بیماری‌زایی و عفونت نقش مهمی دارند. هدف از انجام تحقیق، شناسایی ژن‌های ویرولانس، *lasB*، *plcH*، *plcN* در *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های انسانی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه ناشی از سوختگی پوست در سال ۱۳۹۵ انجام گردید. آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگارانجام شد. DNA ژنومی سویه‌ها استخراج گردید و واکنش Multiplex-PCR برای تعیین فراوانی هر یک از ژن‌ها انجام شد.

یافته‌ها: محدوده سنی افراد مورد مطالعه ۹۰-۲۰ سال می‌باشد. ۴۶ بیمار مرد و ۵۴ بیمار را زنان تشکیل دادند. ژن‌های *plcN* ,*plcH* با فراوانی ۹۸ درصد و فراوانی ژن *lasB* به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. بیش‌ترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین و آمپی‌سیلین به‌ترتیب با فراوانی ۹۶ درصد و ۹۳ درصد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: فراوانی بالای ژن‌های *lasB* ,*plcH* ,*plcN* در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های پوستی حاصل از سوختگی نشان می‌دهد که این ژن‌ها به عنوان فاکتورهای مهم ویرولانس در عفونت‌های حاصل از سوختگی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا، ژن‌های plcN، plcH، lasB*

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیلی گرم منفی، هوازی اجباری، متحرک و فاقد اسپور بوده که به‌صورت ساپروفیت در محیط وجود دارد (۱). این ارگانیسم یک پاتوژن فرصت‌طلب است و تنها هنگامی به‌صورت عامل بیماری‌زا عمل می‌کند که در عملکرد طبیعی سیستم ایمنی نقصی وجود داشته باشد (۵،۴). مهم‌ترین عوامل ویرولانس سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از: پیوسیانین، همولیزین، الاستاز، تشکیل بیوفیلم که به گسترش بافتی و مقاومت آن در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها کمک می‌کند و ریشه‌کنی عفونت در اثر این باکتری بسیار دشوار می‌باشد (۶،۱۰،۱۱). دارا بودن فاکتورهای ویرولانس متعدد و مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد ضدعفونی کننده و گندزداها کلید موفقیت و ماندگاری این ارگانیسم در محیط و بیماری‌زایی می‌باشد (۱۳). مقاومت در این ارگانیسم می‌تواند با منشاء کروموزوم (ذاتی) و یا پلاسمید (اکتسابی) باشد که در این حالت به سهولت در بین سویه‌ها و گونه‌های مختلف حتی بین جنس‌های مختلف

نویسنده مسئول :گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین،ایران
پست الکترونیکی: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.3.2]

باکتریایی به صورت افقی منتقل می‌شود (۱۵،۱۶). الاستازها به شکل دو آنزیم *lasA* و *lasB* می‌باشند که به‌صورت سینرژیسم عمل نموده و الاستین را تجزیه می‌کنند. این ژن‌ها در *سودوموناس آئروژینوزا* توسط کروم سنسینگ[1] کنترل و بیان می‌شوند که حساسیت جمعیتی در باکتری را به عهده داشته به‌طوری که ارتباط سلول به سلول بر عهده این ژن‌ها می‌باشد و رونویسی و ترجمه را تحت تأثیر قرار داده و اطلاعات را مبادله می‌کند و در بیماری‌زائی این باکتری نقش مؤثر دارند. این عمل سبب آسیب به بافت‌های دارای الاستین شده و در نتیجه منجر به آسیب پارانشیمی ریه و ضایعه‌های خونریزی دهنده پوست می‌شوند. عفونت‌های مزمن سودوموناسی به‌وسیله تشکیل آنتی‌بادی‌هایی علیه *lasA* و *lasB* و رسوب کمپلکس‌های ایمنی در بافت‌های عفونی، مشخص می‌شوند (۱۸،۱۹،۲۱). *سودوموناس آئروژینوزا* دو نوع همولیزین تولید می‌کند: فسفولیپاز C (PLC) که حساس به حرارت است و رامنولیپید مقاوم به حرارت می‌باشد. ژن‌های *plcH* و *plcN* فسفولیپاز C را تولید می‌کنند و فسفولیپاز C فسفولیپید را هیدرولیز می‌کند. فسفولیپاز C و رامنولیپید، همولیزین‌های تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* هستند که به‌طور سینرژیسم لیپیدها و لکتین را تخریب می‌کنند. هر دو همولیزین به‌واسطهٔ خاصیت سیتوتوکسیک‌شان درتهاجم بافتی شرکت دارند. اعتقاد براین است که رامنولیپید با حل کردن فسفولیپیدهای غشاء سلول‌های ریوی امکان دستیابی فسفولیپاز C را به آن‌ها فراهم می‌سازد. هم‌چنین رامنولیپید عملکرد طبیعی سلول‌های مژکدار اپی تلیال تنفسی انسان را مهار می‌کند (۲۱). از عناصر تکراری کوتاه[2] که در بین انتروباکتریا سه‌ها کشف شدند عناصر تکراری کوتاه بین ژنومی پیوسته می‌باشد (Enterobacteria repetitive intergenic consensus) که از ۶۹-۱۲۷ bp جفت باز در طول متغیر می‌باشد و سکانس‌ها یا توالی‌های پالیندرومیک[3] بزرگی را در مرکز محافظت می‌کنند در تعیین توالی ژنوم *Ecoli* ،۳۱۴ توالی REP و ۱۹ توالی ERIC کشف شد. تکثیر REP یا ERIC را می‌توان به‌وسیله دو پرایمر تکی ، یک مجموعه از پرایمرها و یا مجموعه‌های متعددی از پرایمر ها انجام داد، الگوهای اریک ERIC به‌طور معمول پیچیدگی کم‌تری نسبت به الگوهای REP دارند ولی هر دو ترکیب خوبی در سطح سویه ارائه می‌دهند، به‌کارگیری هر دو روش در کارهای تحقیقاتی قدرت تمایز آن‌ها را نسبت به زمانی‌که هر یک از روش‌ها به تنهایی استفاده می‌شوند افزایش می‌دهند. در حالی‌که توالی های ERIC,REP رایج‌ترین اهداف مورد استفاده جهت طبقه‌بندی DNA می‌باشند یکی از توالی‌های تکرار شوند BOX [4] می‌باشد که برای اولین بار در تمایز استرپتوکوک پنومینه استفاده شده است (۲۶).

در تحقیق‌های بعدی مشخص شد که این آزمایش‌های در باکتری سودوموناس آئروژینوزا نیز برای تمایز سویه‌ها قابل انجام است.

سودوموناس آئروژینوزا به‌طور ژنتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا می‌کند، به‌طوری که باکتری با ایجاد تغییرهایی در پروتئین‌های غشاء خارجی موجب کاهش نفوذپذیری این غشاء نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. هم‌چنین با ایجاد تغییرهایی در آنزیم‌های باکتری موجب افزایش مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد (۱۹،۲۲). لذا هدف از انجام تحقیق، جداسازی مولکولی هم‌زمان ژن‌های ویرولانس *lasB*، *plcH* و *plcN* در نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex-PCR و تعیین و مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی وشناسایی باکتری

در این مطالعه توصیفی- مقطعی درسال ۱۳۹۵ انجام شد. تعداد ۱۶۵ نمونه از عفونت ناشی از سوختگی پوست از بیماران با محدوده سنی ۹۰-۲۰ سال از مرکز سوانح سوختگی تهران جمع آوری شد. تمامی نمونه‌ها به آزمایشگاه تحقیقاتی و پژوهشی گروه میکروب‌شناسی پاسارگاد منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌های به‌دست آمده بر روی محیط بلاد آگار، مک کانکی و ستریمید آگار (مرک، آلمان) کشت داده و پس از گرمخانه گذاری[1] در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت از نظر تشکیل کلنی و رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تأیید کلنی‌های رشد یافته مشکوک به *سودوموناس آئروژینوزا* از آزمایش‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر؛ رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، سیترات، TSI، اندول، متیل رد و ووگس پروسکوئر(MR-VP)، اوره آز، تست OF (اکسیداسیون-تخمیر)، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تولید پیگمان در محیط ستریمید

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.3.2]

آگار (مرک، آلمان) استفاده شد (۱۸). در این مطالعه از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 به‌عنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام)

بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards institute) انجام گردید (۷). تعدادی از کلونی باکتری را به‌وسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیده و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید. جهت انجام این آزمون دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین (Fox) ۳۰ mg، ایمی‌پنم (IMP) ۳۰ mg، جنتامیسین (GM) ۱۰ mg، آمپی-سیلین (AM) ۱۰ mg، سولفومتوکسازول (STX) ۳۰mg، سیپروفلوکساسین (CP) ۳۰mg، تتراسایکلین (T) ۳۰mg، آزترئونام (AZT) ۳۰ mg، تهیه شده از پادتن طب استفاده شد.

تکثیر ژن‌های ویرولانس

به‌منظور تکثیر ژن‌های ویرولانس، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از کیتMolecular Biological System Transfer (شرکت سیناژن، ایران) استخراج گردید. برای تکثیر ژن‌های از توالی‌های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد که از مقاله (۱۶) استفاده گردید. جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. در نهایت، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR master mix 2X (۱ واحد آنزیم Tag DNA polymeras , سه میلی‌مول $Mgcl_2$ و۴۰۰ میکرومول از هر کدام از $dNTP_S$) (سیناکلون، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به (غلظت ۰/۸ میکرومولار)، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۲/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل تهیه و با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر(اپندورف، آلمان) بدین صورت انجام پذیرفت: واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. در پایان، محصول‌های واکنش multiplex-pcr در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵µg/ml) در مقایسه با سویه استاندار *سودوموناس آئروژینوزا* حاوی ژن‌های مورد نظر الکتروفورز گردید.

جدول۱: توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌ها

ژن	توالی پرایمرها ('۳→'۵)	اندازه محصول(bp)
plcH	F= GCACGTGGTCATCCTGATGC R= TCCGTAGGCGTCGACGTAC	۶۰۸
lasB	F= GGAATGAACGAAGCGTTCTC R= TGGCGTCGACGAACACCTC	۲۸۴
plcN	F= TCCGTTATCGCAACCAGCCCT R= AGGTCGAACACCTGGAACAC	۴۸۱

ERIC PCR

در این مطالعه جهت بررسی تکراری نبودن نمونه‌ها و هم‌چنین جهت تعیین الگوی سویه‌های باکتری‌های جدا شده از آزمون ERIC PCR استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق شامل پرایمر رفت ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC و پرایمر برگشت AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG بود. این واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل(۱۲/۵ میکرولیتر PCR master mix 2X) ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به (غلظت ۰/۸ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل تهیه در برنامه زمانی زیر انجام شد: واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۴۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. در پایان، محصول‌های واکنش multiplex-pcr در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵µg/ml) در مقایسه با سویه

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.3.2]

استاندار *سودوموناس آئروژینوزا* حاوی ژن‌های مورد نظر الکتروفورز گردید.

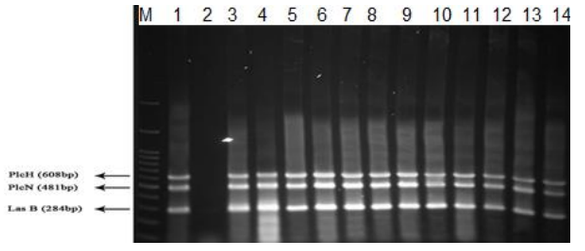
یافته‌ها

ویژگی نمونه‌های مورد مطالعه و جداسازی باکتری

در مطالعه حاضر محدوده سنی افراد تحت مطالعه بین ۲۰ الی ۹۰ سال بوده است. نمونه‌ها از گروه‌های مختلف سنی شامل؛ ۲۰-۳۰ سال (تعداد:۲ نفر)، ۳۰-۴۰ سال (تعداد: ۸ نفر)، ۴۰-۵۰ سال (تعداد : ۱۶ نفر) و افراد بیش‌تر از ۵۰ سال (تعداد: ۷۴ نفر جمع آوری گردید. (٪۴۶) مرد و (٪۵۴) بیمار را زنان تشکیل می‌دادند.

تکثیر ژن‌های ویرولانس با روش Multiplex-PCR

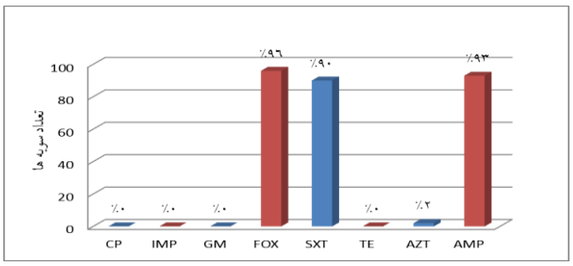
نتایج حاصل از آزمون Multiplex-PCR به‌منظور تکثیر ژن‌های ویرولانس *lasB, plcH, plcN* بر روی تمامی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که در این بررسی بیش‌ترین میزان فراوانی در بین نمونه‌ها مربوط به ژن *lasB* به میزان ۱۰۰ درصد بوده است و ژن‌های *plcH, plcN* به میزان ۹۸ درصد وجود داشت. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول‌های multiplex-PCR در تصویر ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱: نتایج واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های ویرولانس ،راهکM-مارکر ۱۰۰ bp (فرمنتاز)، راهک۱- کنترل مثبت، ۲-کنترل منفی، راهک‌های ۱۴-۳ نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، همه نمونه‌ها دارای ژن*lasB, plcH, plcN* می‌باشند.

نتایج آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن :

در نمونه‌های اخذ شده بیش‌ترین میزان مقاومت مربوط به آنتی-بیوتیک‌های سفوکسیتین و آمپی‌سیلین به ترتیب ۹۶ و ۹۳ درصد بوده و سپس مقاومت به میزان ۹۰ درصد نسبت به سولفومتوکسازول مشاهده گردید (نمودار ۱) (جدول ۲).



نمودار ۱- توزیع فراوانی میزان مقاومت کلیه سویه های نسبت آنتی بیوتیک‌ها

جدول ۲: میزان حساسیت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر حسب تعداد و درصد

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت Resistance	حساسیت متوسط Intermediate	میزان حساسیت Sensitive
سیپروفلوکساسین	-	۱ (٪۱)	۹۹ (٪۹۹)
ایمی پنم	-	۱ (٪۱)	۹۹ (٪۹۹)
جنتامیسین	-	-	۱۰۰ (٪۱۰۰)
سفوکسیتین	۹۶ (٪۹۶)	۴ (٪۴)	-
تری‌متوپریم- سولفومتوکسازول	۹۰ (٪۹۰)	۱۰ (٪۱۰)	-
تتراسایکلین	-	-	۱۰۰ (٪۱۰۰)
آزترئونام	۲ (٪۲)	-	۹۸ (٪۹۸)
آمپی سیلین	۹۳ (٪۹۳)	۷ (٪۷)	-

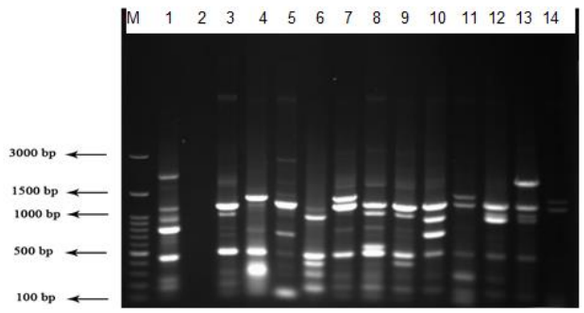
نتایج حاصل از ERIC PCR

نتایج به‌دست آمده توسط نرم افزار genAlex آنالیز گردید. اکثر ایزوله‌ها دارای ۵ الگوی باندی در نواحی ۳۰۰۰bp، ۱۵۰۰ bp ، ۱۰۰۰ bp، ۵۰۰ bp و ۱۰۰ bp بودند. نمونه-هایی که در یک گروه قرار دارند دارای شباهت ژنتیکی بالای ۹۵٪ می‌باشند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و ترسیم دندروگرام بر اساس شباهت‌های ژنتیکی، نمونه‌های مورد مطالعه را به هشت گروه مجزا تفکیک نموده است که

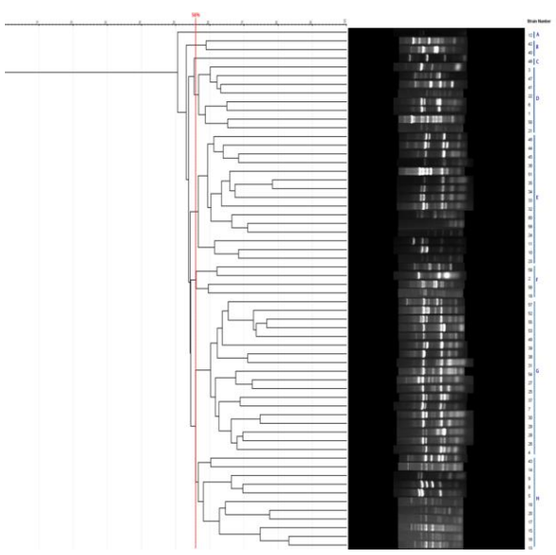
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.3.2]

گروه‌های A-H نامیده می‌شوند. گروه G گروه غالب بوده و ۳۰٪ از کل نمونه‌ها را شامل می‌شود. گروه E بعد از گروه G دارای بیش‌ترین تعداد نمونه بوده و ۲۵٪ کل نمونه‌ها را شامل شده است. گروه H نیز ۱۸/۳۳ درصد نمونه‌ها و گروه D، ۱۳٪/۳۳ نمونه‌ها و گروه F، ۶٪/۶۶ نمونه‌ها، گروه B، ۳٪/۳۳ نمونه‌ها، گروه A و C، ۱٪/۶۶ نمونه‌ها را شامل شده اند.



شکل ۲: الگوی باندی حاصل از ERIC PCR سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از پرایمرهای ERIC بر روی ژل آگارز، به ترتیب از سمت چپ: M: مارکرbp ۱۰۰، راهک ۲- کنترل مثبت. راهک۳- کنترل منفی. راهک۱۴-۳محصول‌ها ERIC PCR سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*



شکل ۳: دندوگرام رابطه ژنتیکی ایزوله سودوموناس آئروژینوزا .نتایج به‌دست آمده از ERIC PCR با استفاده از دو پرایمر

بحث

استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی سبب بروز سویه‌های مقاوم شده است (۲۲). این مقاومت به‌وسیله القاء آنزیم‌های غیر فعال کننده آنتی‌بیوتیک‌ها یا موتاسیون در ژن‌های کد کننده پروتیئن‌های غشای خارجی، تغییر در گیرنده یا محل اثر آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد می‌شود (۹). در تحقیقی که واعظ و همکارانش بر روی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های مختلف بالینی در اصفهان انجام دادند، سودوموناس آئروژینوزا نسبت به سیپروفلوکساسین ۵۳/۷ درصد مقاومت نشان داد (۳۰). در تحقیق فاضلی و همکاران بر روی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جمع‌آوری شده از زخم‌های سوختگی، ۹۸/۷ درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین گزارش شد (۱۲). در صورتی‌که خلجی و همکاران میزان حساسیت به سیپروفلوکساسین در سودوموناس را ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۲۰). مقایسه نتایج این تحقیق (۹۹ درصد حساسیت) با تحقیق‌های دیگر نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها کم‌تر بوده و هنوز کارآیی لازم را جهت درمان بیماران مبتلا به این باکتری دارا می‌باشد. عربستانی و همکاران نشان دادند که ۹/۶ ٪ سویه‌ها نسبت به ایمی‌پنم مقاومند که با نتایج حاصل از این مطالعه تفاوت دارد (۲)، در صورتی‌که میهنی و همکاران طی پژوهشی که بر روی نمونه‌های جداشده بیمارستان سوانح و سوختگی طالقانی اهواز انجام دادند نشان دادند که ۴۱٪ سویه‌ها به ایمی‌پنم مقاوم بودند (۲۴). فاضلی و همکاران در سال ۱۳۸۸ مقاومت ۹۴/۴ درصدی نسبت به ایمی‌پنم را در سویه‌های سودوموناس جدا شده از بیماران سوختگی گزارش کردند که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر اختلاف زیادی دارد (۱۲). مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران دچار سوختگی بیش از سایر موارد است در صورتی‌که در مطالعه حاضر نمونه‌های جداسازی شده از موارد سوختگی به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین و سولفومتوکسازول- تریمتوپریم مشاهده شد که این یک مقاومت ذاتی است که نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در سودوموناس وجود دارد. عفونت پس از سوختگی به‌علت آلوده شدن زخم سوختگی با سودوموناس آئروژینوزا موجود در محیط بیمارستان است. تفاوت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان‌های مختلف مؤید این مطلب است که در مکان‌هایی که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی وجود دارد به‌راحتی از طریق ژنتیکی قابل انتقال است.

در مطالعه آذرگون و همکاران از ۵۱ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، ۳۷/۲٪ مقاوم به جنتامایسین، ۲۱/۵٪ مقاوم به آمیکاسین، ۱۵/۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین و ۹/۸٪ مقاوم به سفتازیدیم بودند (۳).

در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* ایزوله شده از مراکز درمانی شهر اراک

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.3.2]

میزان مقاومت سفتازیدیم (۳۳٪/۳)، آمیکاسین (۲۰٪/۳)، سیپروفلوکساسین (۱۵٪/۷) جنتامایسین (۱۹٪/۴) به‌دست آمد (۲۸)، در صورتی‌که در مطالعه حاضر کم‌ترین میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین ، تتراسایکلین ،ایمی‌پنم و آزترئونام مشاهده گردید و این تفاوت به نظر می‌رسد می‌تواند به دو دلیل باشد: ۱ - ناشی از تفاوت در منبع سویه‌ها ، ۲- به دلیل ایجاد مقاومت درسال‌های اخیر نسبت به این آنتی‌بیوتیک باشد.

بسیاری از فاکتورهای بیماری‌زای باکتری سودوموناس آئروژینوزا به‌وسیله یک سیستم ژنتیکی به نام سیستم کروم سنسینگ (QS) کنترل و تنظیم می‌گردند (۱۹).

در این تحقیق مشخص گردید میزان فراوانی ژن *lasB* در نمونه-های بالینی بیش‌تر بوده و اختلاف در فراوانی سویه‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل محیطی باشد. مقایسه نتایج سایر تحقیق‌ها با نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که استفاده از پرایمرهایی با ویژگی‌های بالا و حساسیت، می‌تواند در تشخیص به موقع و سریع ژن‌های بیماری‌زا در بیماران به کار گرفته شود. با توجه به نوع نمونه‌های جمع آوری شده، نقش این ژن در عوارض ناشی از سوختگی با توجه به نوع آنزیم‌های ترشحی به طور کامل هم-خوانی داشته و مؤید این مطلب است که نوع نمونه نیز می‌تواند در اعلام میزان شیوع ژن‌ها مرتبط باشد.

Lanotte, و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در تحقیقی تحت عنوان بررسی ویژگی‌های ژنتیکی گونه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با سایر نمونه‌های جداسازی شده سودوموناس، به این نتیجه رسیدند که فراوانی ژن‌های *plcN* و *lasB* و *plcH* در نمونه‌ها ۱۰۰ درصد بوده است (۲۱). در حالی‌که Wolska سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف را با روش ERIC PCR گروه‌بندی کرد و مشاهده کرد ۴۹ درصد سودوموناس‌ها در سه گروه قرار دارند و ما بقی باکتری‌ها الگوی منحصر بفردی داشتند، میزان فراوانی ژن‌های lasB و plcH در دسته اول ۱۰۰ درصد و ژن plcN حدود ۹۱ درصد بود و در سودوموناس‌هایی که الگوی منحصر بفردی را نشان دادند میزان فراوانی lasB حدود ۸۴/۶٪ و plcH وplcN حدود ۷۶/۹٪ بود (۳۱).

مطالعه‌های محققان مختلف نشان داد ژن plcN عامل فعالیت-های پیش التهابی (۲۳)، فاکتور بیماری‌زایی(۱۷)، التهاب ریوی(۲۳) و ممانعت از انفجار اسیداتیو در نوتروفیل(۲۹) است.در حالی‌که Fazeli نشان داد توزیع ژن‌های plcN و lasB و plcH در نمونه‌های بالینی مختلف مانند عفونت تنفسی، ادرار، زخم بستر ، سوختگی و زخم تفاوت مشخصی وجود ندارد (۱۴).

در مطالعه حاضر نیز در فراوانی ژن‌های plcN و lasB و plcH در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت سوختگی تفاوت وجود ندارد. هم‌چنین در مطالعه‌های متعددی مشاهده شده این سه ژن در سودوموناس‌های جدا شده از زخم، سوختگی و دستگاه تنفسی دارای فراوانی بالا می‌باشند (۲۷،۲۵،۸).

Zhu و همکارن (۲۰۰۴) فعالیت *lasI*, *lasR* و *rhlR* را در نمونه‌های سودوموناس مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که این ژن‌ها ممکن است با حضور در ایزوله‌های بالینی موجب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی گردد. در صورتی‌که در مطالعه ما حضور ژن *lasB* نشان می‌داد که این ژن در ایجاد مقاومت نقشی نداشته و بیش‌تر در بیماری‌زایی مؤثر می‌باشد (۳۲).

نتیجه‌گیری

استفاده از PCR جهت جداسازی و شناسایی سودوموناس آئروژینوزایی که عفونت پوستی حاصل از سوختگی را ایجاد می-کند مناسب می‌باشد و امکان دارد این ژن‌ها در سایر نمونه‌های بالینی شیوع کم‌تری داشته باشند. با مقایسه نتایج سایر تحقیق‌ها با نتایج به‌دست آمده از بررسی حاضر به‌نظر می‌رسد که روش ERIC کارایی مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارد. از آنجایی‌که اپیدمی‌های عفونت به طور معمول توسط یک کلون خاص و عفونت‌های تک گیر به‌طور معمول توسط کلون‌های مختلف ایجاد می‌شوند، به همین دلیل باید همه ایزوله‌ها توسط روش‌های تایپینگ مناسب انگشت نگاری شوند تا سویه‌های مربوط شناسایی و تعیین هویت شوند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.3.2]

منابع

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).
2. Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi MR, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of efflux pump mexab-oprm and oprd of pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples using PCR. *Arch Iranian Med*. 2015;18: 102-08.
3. Azargoon R, Doustdar F, Khanbabaei G, Ghazi M, Mehrnejad F, Goudarzi H. Type III secretion system characterization of Pseudomonas aeruginosa isolates associated with cystic fibrosis. Research in Medicine. 2013; 37 (3) :1890-193 [Persian]
4. Bielecki P, Glik J, Kawecki M, dos Santos VAM. Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol lett*. 2008;30(5):777-90.
5. Champagne CP, Laing RR, Roy D, Mafu AA, Griffiths MW, White C. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1994;34(1):1-30.
6. Cheng X, Wang P, Wang Y, Zhang H, Tao C, Yang W, et al. Identification and distribution of the clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-βlactamase and/or class 1 integron genes. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2008;28:235-8.
7. Clinical and laboratory standard institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100-S17. Wayne: CLSI;2007 .
8. Cotar AI, Chifiriuc MC, Banu O, Lazar V. Molecular characterization of virulence patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from respiratory and wound samples. Biointerface Res Appl Chem 2013; 3: 551-558.
9. Lambert P. Mechanisms of antibiotic resistance in *pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med 2002;95: 22.
10. Cockerill FR, Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: approved standard. National Committee for *Clinical Laboratory Standards*; 2012.
11. Daly M, Power E, Björkroth J, Sheehan P, O'Connell A, Colgan M, et al. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(6):2723-9.
12. Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in Pseudomonas aeruginosa strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9*). Iran J Med Microbiol*. 2010; 3 (4) :1-8.
13. Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Asadian A, Faghihinia J, Saneeyan H, et al. Detection of morphotyping characteristics identification antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Isfahan Med Sci*. 2012;29(171):1-12 .[Persian]
14. Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iranian Hospital Infections. Iran Red Crescent Med J. 2014 October; 16(10): e15722
15. Ferguson MW, Maxwell JA, Vincent TS, da Silva J, Olson JC. Comparison of the exoS gene and protein expression in soil and clinical isolates *of Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun*. 2001;69(4):2198-210.
16. Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol*. 2011;2.
17. Idris SN, Desa MN, Aziz MN, Taib NM. Antimicrobial susceptibility pattern and distribution of exoU and exoS in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa at a Malaysian hospital. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012;**43**(1):116–23.
18. Imani Foolad A, Hosainzadeh M, Mousavi SF. Association between exotoxin a (exo-a) gene and antibiotic resistance pattern with biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ardabil Uni Med Sci.* 2011;11(1):7-13 .[Persian]
19. Jiang Q, Yang Y, Xin K, Bian X, Li M, Zhang B, et al. Microbial diversity analysis of subclinical mastitis in dairy cattle in Northeast China. *Afr J Microbiol Res*. 2015;9(10):687-94.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.3.2]

20. Khalaji Y, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Molecular evaluation of antibiotic resistance prevalence in *Pseudomonas aeroginosa* isolated from cockroaches in Southwest Iran. 2013;5(9):420-4.
21. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol.* 2004;53(1):73-81.
22. Makedou K, Tsiakiri E, Bisiklis A, Chatzidimitriou M, Halvantzis A, Ntoutsou K, et al. Changes in antibiotic resistance of the most common Gram-negative bacteria isolated in intensive care units. *J Hosp Infect*. 2005;60(3):245-8.
23. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from Pseudomonas aeruginosa PAO1. *J Bacteriol.* 2001;**183**(21):6454–65.
24. Mihani F, Khosravi A. Isolation of pseudomonas aeruginosastrains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM genes by PCR. *Iran J Med Microbiol*. 2007;1: 23-31.
25. Nikbin VS, Aslani MM, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour GH. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. Iraninan J Microbiol 2012; 4: 118-123.
26. Putman . M .van, Veen .H .W ,2000 , molecular properties of bacterial multidrug transporters.
27. Sabharwal N, Dhall Sh, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. Int J Mol Epidemiol Genet 2014;5(3):125-134.
28. Taghvaee R, Shojapour M, Sadeghi A, Pourbabay AA. The Study of Antibiotic Resistance Pattern and the Frequency of Extended-Spectrum¬Beta-Lactamases (ESBL) in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Medical Centers in Arak City, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2013; 7(4): 36-41.
29. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AI, Vasil ML. Pseudomonas aeruginosa hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun.* 1999;**67**(5):2371–6.
30. Vaez H, Faghri J, Esfahani BN, Moghim S, Fazeli H, Sedighi M, et al. Antibiotic Resistance Patterns and Genetic Diversity in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Patients of a Referral Hospital, Isfahan, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(8).
31. Wolska K, Szweda p.Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains.polish j Mic.2009.58(3). 255-260.
32. Zhu H, Bandara R, Conibear TCR, Thuruthyil SJ, Rice SA, Kjelleberg S, Givskov M and Willcox MDP. *Pseudomonas aeruginosa* with LasI Quorum-Sensing Deficiency during Corneal Infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45: 1897-1903.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.3.2]