بررسی فراوانی ژن اگزوتوکسین A و حساسیت روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در زخم سوختگی

رسول یوسفی مشعوف[۱]
رسول اسماعیلی[۲*]
محمد یوسف علیخانی[۱]
مهدی قنبری[۱]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
۲- دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

*نویسنده مسئول: همدان، خیابان شهید فهمیده، روبه‌روی پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی
تلفن: ۰۸۱۱-۸۳۸۰۴۵۴
E-mail: r.esmaeili@umsha.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۳ آنلاین: ۱۳۹۳/۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت‌طلبی است که در تمام محیط‌ها قدرت زیست داشته و عامل بسیاری از عفونت‌های شدید در انسان مانند آندوکاردیت، منتژیت، سپتی‌سمی و عفونت‌های مزمن ریه در بیماران سیستیک فیبروزیس می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن اگزوتوکسین A (exotoxin A, ETA) به‌عنوان یک فاکتور ویرولانس قوی و تعیین حساسیت روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی بود.

روش بررسی: در این مطالعه ۱۷۰ نمونه (بیوپسی پوست و خون) از بیماران سوختگی درجه دو و سه بستری در بیمارستان بعثت همدان، ایزوله گردید که ۷۹ سویه کشت مثبت سودوموناس آئروژینوزا را نشان دادند. سپس ژنوم سویه‌های شناخته‌شده با استفاده از کیت تخلیص ژنوم استخراج و شناسایی سودوموناس آئروژینوزا از طریق روش Polymerase Chain Reaction (PCR) انجام شد. جهت تعیین حساسیت روش PCR، از روش کشت به‌عنوان روش استاندارد طلایی استفاده شد. DNA سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853) به‌عنوان کنترل مثبت لحاظ گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که از ۷۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا ایزوله‌شده از بیماران سوختگی، پنج سویه (۶/۳۳٪) فاقد ژن ETA بودند و ۷۴ سویه (۹۳/۶۷٪) سودوموناس آئروژینوزا جدا شده دارای ژن ETA بودند که حساسیت آزمایش ۹۴/۰۴٪ درصد تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصله نشان می‌دهد که حساسیت روش PCR با واسطه ژن ETA در شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا قابل توجه بوده و می‌توان از آن به‌عنوان یک فاکتور موثر با دقت بالا در تشخیص سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، سوختگی، اگزوتوکسین A، PCR.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یکی‌از عوامل عفونی فرصت‌طلب است که می‌تواند در طیف وسیعی از بیماران مبتلا به ضعف ایمنی شامل افراد مبتلا به سرطان، سیستیک فیبروزیس (CF)، سوختگی و غیره، عفونت‌های کشنده‌ای ایجاد کند.[۱-۳] این باکتری دارای عوامل ویرولانس متنوعی مانند انواع پروتئازها، اگزوتوکسین‌ها، پلی‌ساکاریدها، فلاژل و غیره است.[۴] سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان دومین باکتری بیماری‌زای رایج در جراحی‌ها و سومین عامل شایع و متداول عفونت‌های بیمارستانی بعد از اشرشیاکلی و استاف‌اورئوس است که حدود ۱۰٪ عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهد.[۵] روش‌های اولیه شناسایی سودوموناس آئروژینوزا بیشتر بر مبنای خصوصیات فنوتیپی هستند و محصولات ژنی را شناسایی نمی‌کنند این روش‌ها شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی‌ژنی است.[۶] ماهیت طبیعی و اکتسابی این میکروارگانیسم در مقاومت

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-25]

به انواع آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مرگ‌ومیر ناشی از آن باعث شده که پژوهشگران به‌دنبال روش‌های نوین تشخیص سریع باکتری به‌منظور درمان و جلوگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری باشند.

بنا بر آنچه گفته شد تشخیص سریع عامل عفونت ضروری به‌نظر می‌رسد، سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل ایجاد کننده سپتی‌سمی در بیماران مبتلا به سوختگی است که شناسایی آن با روش‌های مرسوم به سه تا چهار روز زمان نیاز دارد که این زمان برای بیمار دچار سپتی‌سمی، طولانی است.[۵و۶] محصول ژن اگزوتوکسین A (ETA) آنزیمی است که سبب کاتالیز ADP- ریبوزیلاسیون گردیده و موجب عدم انتقال +NAD و حرکت آن به EF2 (فاکتور طویل‌سازی) در سنتز پروتیین‌های میزبان شده و مرگ سلولی را سبب می‌شود.[۷] مطالعات کلینیکی نشانگر آن است که ETA در بین فاکتورهای متعدد ویرولانس سودوموناس آئروژینوزا، مهمترین عامل بیماری‌زایی است به‌طوری‌که سمی‌ترین پروتیین تولید شده به‌وسیله آن ETA می‌باشد که در اکثر سودوموناس آئروژینوزاهای ایزوله‌شده از بیماران دارای جراحت، عفونت مجاری ادراری، عفونت‌های دستگاه تنفسی و در سرم بیماران CF عفونی‌شده با سودوموناس آئروژینوزا ETA نمایان شده است.[۸و۹] برای تشخیص این میکروارگانیسم می‌توان از طریق واکنش زنجیره پلیمراز DNA باکتری استفاده نمود.

از روش PCR زمانی‌که استفاده از روش کشت در بیمارانی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند استفاده می‌کنند. از آنجا که روش‌های مرسوم میکروبی و ایمونولوژیکی جهت تشخیص باکتری سودوموناس آئروژینوزا که نیاز به زمان و مواد زیادی می‌باشد، در تشخیص طبی مقرون به صرفه نیست، بنابراین روش PCR یک روش دقیق و سریع جهت تشخیص پاتوژن‌ها حتی در حالت غیر زنده است که باعث کنترل سریع عفونت و کاهش مرگ‌ومیر ناشی از آن می‌شود.[۸و۱۰] مطالعات مختلف نتایج متفاوتی از فراوانی این ژن و حساسیت PCR و مقایسه آن با روش کشت ارایه داده‌اند.[۱۱و۱۲] این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژن ETA و حساسیت روش PCR در شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزاهای جداشده از بیماران مبتلا به سوختگی انجام شد.

روش بررسی

مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر که از فروردین تا اسفند سال ۱۳۹۱ به‌طول انجامید بر روی ۱۷۰ نمونه (بیوپسی پوست و خون) از بیماران سوختگی (درجه دو و سه) بستری در بیمارستان بعثت همدان به‌طور تصادفی، انجام گردید. نمونه‌های پوستی توسط سوآپ استریل از ناحیه پوست بیماران دچار عفونت سوختگی تهیه شد.

لازم به‌ذکر است نمونه‌برداری از بیماران صبح‌ها قبل‌از تعویض پانسمان صورت گرفت. در برداشت از نقاطی استفاده شده که به‌طور عمقی سوخته بود و سپس نمونه‌ها در محیط کشت نوترنیت آگار کشت داده و در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد. سپس باکتری سودوموناس آئروژینوزا توسط تست‌های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، اکسیداز، TSI، تست سیترات، اندل، MRVP و تولید پیگمان شناسایی و پس‌از کشت در محیط کشت LB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی ۲۰٪) در دمای ۴ °C ذخیره شد.[۶]

جمع‌آوری نمونه‌های خونی در بیماران با دمای بیش از ۳۸/۵ °C که نشاندهنده باکتریمی می‌باشد قابل اجرا است. نکته‌ای که باید در این نوع نمونه‌برداری خاطرنشان نمود عدم مصرف هرگونه آنتی‌بیوتیک توسط بیماران بود، بدین‌ترتیب که حدود ۱۰ ml از خون بیماران سوختگی را پس‌از نمونه‌برداری با رعایت شرایط آسپتیک در محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) تلقیح نموده و به‌طور معمول بعد از طی هفت روز از لحاظ ماکروسکوپی شاخص‌های رشد از قبیل کدورت، لیز شدن، ایجاد گاز و غیره مورد بررسی قرار گرفتند که در این میان از شیشه‌های کشت خون مشکوک به رشد میکروارگانیسم بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و شکلات آگار به‌منظور به‌دست‌آوردن کلنی‌های تک و ایزوله کردن آنها، کشت شد و سپس از نظر مورفولوژی، بوی کلنی و خصوصیات باکتری در لام رنگ‌آمیزی‌شده به طریقه گرم، مورد بررسی قرار گرفتند. پس‌از به‌دست‌آوردن کلنی‌های مجزا از نمونه‌های بالینی گردآوری شده، آزمایشات تشخیصی بیوشیمیایی انجام شد. در مرحله اول کلنی‌های مجزا بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند، تا از نظر رنگ پیگمان مورد بررسی قرار گیرند. سپس تست‌های افتراقی اولیه برای تعیین گونه سودوموناس که شامل تست اکسیداز، کشت بر روی محیط KIA، Urea و SIM بودند، بر روی آن انجام شد.[۶و۸و۹]

طراحی پرایمر: جهت تشخیص سودوموناس آئروژینوزا، ژن ETA بر روی کروموزوم باکتری به‌عنوان ژن هدف استفاده شد. این ژن یک ژن ۱۹۱۷ جفت بازی است که توالی نوکلئوتیدی آن از اطلاعات بانک

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-25]

ژنی (Genebank database) استخراج و بخشی‌از ژن انتخاب و با نرم‌افزارهای DNASIS (Sinagen, version 3, Iran) و Oligo (version 3, Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, USA)، پرایمر بالادست (Forward primer) و پرایمر پایین‌دست (Reverse primer) طراحی و سنتز (Genfanavaran Co., Iran) گردید. توالی‌های پرایمر بالادست و پایین‌دست عبارت بودند از:

PBF: 5′- TGC TGC ACT ACT CCA TGG TC -3′
PBR: 5′- ATC GGT ACC AGC CAG TTC AG -3′

تخلیص DNA باکتری: سویه‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا در محیط LB-broth به‌مدت ۱۲ ساعت رشد و ml ۵ از کشت ۱۲ ساعته باکتری‌های مورد آزمایش در محیط LB مایع در دور g ۱۴۰۰ به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ژنوم کروموزومی باکتری‌ها با استفاده از کیت تخلیص ژنوم High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) استخراج و در دمای °C ۴ نگهداری و جهت بررسی کیفیت محصول تخلیص شده DNAی ژنومی باکتری‌ها روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد. برای اندازه‌گیری غلظت DNA نیز از اسپکتروفتومتر در طول‌موج‌های nm ۲۶۰ و nm ۲۸۰ استفاده گردید.

واکنش PCR جهت شناسایی ژن ETA: برای انجام PCR از پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن ETA استفاده گردید. PCR با µl ۵۰ مخلوط حاوی µl ۵ بافر ۱۰X، µl ۱/۵ Mgcl2، µl ۴ dNTP، µl ۰/۵ آنزیم Taq پلیمراز، µl ۲ از هر پرایمر (۱۰ pm/µl)، µl ۱ از نمونه DNA (۲۰۰ ng/µl) انجام شد. این مخلوط در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفته و با برنامه واسرشتگی (Denaturation) اولیه در °C ۹۴ به‌مدت پنج دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با برنامه واسرشتگی در °C ۹۴ به‌مدت یک دقیقه، اتصال (Annealing) پرایمرها به DNA هدف در °C ۶۰ به‌مدت یک دقیقه و طویل‌شدن (Extension) در °C ۷۲ به‌مدت یک دقیقه دنبال شد. مرحله طویل‌سازی نهایی به‌مدت هفت دقیقه در دمای °C ۷۲ بود. جهت بررسی محصول PCR، µl ۵ از آن‌را جهت الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪ انتقال داده، سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت.[۶و۱۲]

یکی‌از روش‌های بهینه‌سازی واکنش PCR به‌کار بردن نمونه‌های کنترل موجود جهت روش PCR به دو صورت کنترل منفی و مثبت است که به‌صورت تجاری در دسترس می‌باشد. در هر سری واکنش انجام حداقل دو واکنش کنترل منفی یکی فاقد DNA الگو و دیگری فاقد پرایمر به موازات نمونه‌های مورد آزمایش جهت بررسی وجود هرگونه آلودگی و عدم اختصاصیت ضروری است که در روش پژوهش موردنظر از سویه کنترل مثبت MIC No. 011 (ATCC 25873) انیستیتو پاستور ایران استفاده گردید. در نهایت داده‌ها پس‌از جمع‌آوری توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویراست ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این بررسی ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری‌شده کشت داده شده و بر اساس آن سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدند. از ۱۷۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۷۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا بودند (جدول ۱).

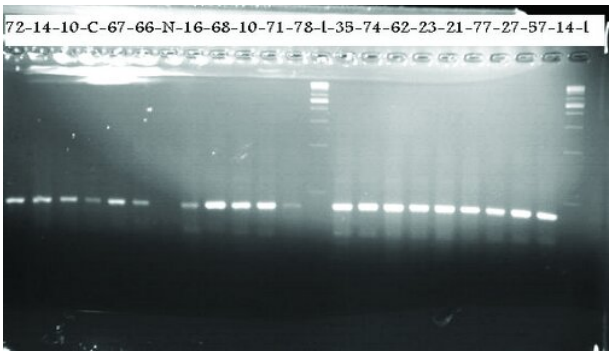
جهت تعیین حساسیت روش PCR در شناسایی سویه‌های سودوموناآئروژینوزا، از پرایمرهای اختصاصی برای انجام PCR بر روی سویه‌های سودوموناشناسایی‌شده به‌کمک روش کشت به‌عنوان روش استاندارد طلایی استفاده شد. پس‌از بررسی نتایج PCR، باندهای به‌دست‌آمده به وزن ۳۹۶ جفت باز به‌عنوان قطعه موردنظر از ژن ETA تایید گردید و به‌عنوان سویه‌های حمل‌کننده ژن ETA مدنظر قرار گرفت (شکل ۱). بنابراین از مجموع ۷۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا، فراوانی ژن ETA به‌روش PCR تعیین گردید. بدین‌ترتیب از ۷۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا، در ۷۴ سویه (۹۳/۶۷٪) ژن ETA مشخص گردید.

در جدول ۲ فراوانی ژن ETA بر حسب تعداد موارد مثبت و منفی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شده است. براساس فرمول تعیین حساسیت (تعداد موارد مثبت واقعی/ تعداد موارد مثبت واقعی + تعداد موارد منفی کاذب)، حساسیت روش مذکور ۹۴/۰۴٪ محاسبه شد.

جدول ۱: فراوانی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های جداشده از بیماران بر اساس روش کشت

عنوان	فراوانی	درصد
سودوموناس آئروژینوزا	۷۹	۴۶/۴۷
سایر میکروارگانیسم‌های ایزوله‌شده	۹۱	۵۳/۵۳
مجموع	۱۷۰	۱۰۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-25]



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR ژن ETA در باند ۳۹۶ bp بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ (L) مارکر ۱ kb (N) کنترل منفی (c) سویه کنترل مثبت (Pseudomonas aeruginosa ATCC 25873) و ۱۰ و ۱۴ و ۷۲ سویه‌های ژنوتیپ مثبت دارای ژن ETA

جدول ۲: فراوانی ژن ETA بر حسب تعداد موارد مثبت و منفی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

نتایج	موارد مثبت	موارد منفی	مجموع
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
ETA	۷۴(٪۹۳/۶۷)	۵(٪۶/۳۳)	۷۹(٪۱۰۰)

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یکی‌از عوامل فرصت‌طلب و جدی در عفونت‌های بیمارستانی مانند سوختگی‌های شدید و بیماران دچار سیستیک فیبروزیس می‌باشد. این باکتری به‌علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی توانسته است به‌تنهایی ۳۰٪ عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص بدهد. اگرچه امروزه می‌توان سودوموناس آئروژینوزا را با استفاده از چند تست در آزمایشگاه تشخیص داد ولی گاهی به دلایلی مانند کلونیزه شدن زخم سوخته با سودوموناس و یا فقدان پاسخ نوتروفیلیک مناسب به تهاجم بافتی، این میکروارگانیسم می‌تواند حتی بیمار را به فاز باکتریمی و سپتی‌سمی ببرد که نتیجه آن مرگ بیمار است.[۱۳و۱۴]

همان‌طور که اشاره شد روش‌هایی که امروزه جهت شناسایی سودوموناس آئروژینوزا به‌کار می‌رود بیشتر بر مبنای خصوصیات فنوتیپی و ظاهری این باکتری شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی‌ژنی هستند و قادر به شناسایی از طریق ژنوم آن نمی‌باشند. ضعف این روش‌های فنوتیپی این است که با تغییر شرایط خارجی، مرحله رشد و جهش‌های ژنتیکی تصادفی ممکن است تغییر پیدا کرده و حتی این تغییرات به‌حدی قوی باشند که منجر به اخذ نتایج کاذب شود.[۶]

این روش‌های فنوتیپی بر مبنای رشد روی محیط کشت به‌دنبال جداسازی، آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی است، اما علاوه بر مشکلاتی که در رابطه با این روش‌ها بیان شد شناسایی این باکتری در نمونه‌ها با روش‌های استاندارد نیز مشکل و وقت‌گیر و حداقل ۴-۳ روز برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا زمان نیاز دارد.[۵و۶] روش‌های ایمونولوژیکی نیز فاقد حساسیت کافی هستند در حالی‌که در صورت بروز برخی‌از موارد آلودگی به عملکرد فوری نیاز است. به‌علاوه این روش‌ها ممکن است در صورت آلودگی نمونه با مقدار زیاد باکتری‌های دیگر به‌علت تداخل در رشد سودوموناس آئروژینوزا منجر به ایجاد نتایج منفی شود.[۶و۱۰]

از سویی دیگر به‌دنبال پیشرفت‌هایی که در روش‌های ژنتیک مولکولی صورت گرفته و به‌کمک آنها می‌توان ژن‌های منحصر به فردی را در سودوموناس آئروژینوزا نشانه گرفت و آن را از سایر گونه‌ها متمایز کرد از این روی می‌توان از این روش‌ها به‌عنوان یک روش دقیق‌تر که نسبت به روش‌های فنوتیپی به‌میزان کمتری نسبت به تغییرات محیطی تحت تاثیر قرار می‌گیرند استفاده کرد.

بر این اساس در این مطالعه ما به بررسی فراوانی ژن ETA در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزاهای جداشده از بیماران مبتلا به سوختگی پرداختیم تا با برآورد این فراوانی تعیین کنیم که آیا این ژن، قابلیت ردیابی این میکروارگانیسم را از طریق روش‌های مولکولی در سویه‌های مورد مطالعه دارد یا خیر. در این بررسی از ۱۷۰ نمونه بیماران بستری در بخش سوختگی، ۷۹ مورد کشت مثبت سودوموناس آئروژینوزا را نشان دادند که PCR توانست ۷۴ مورد (٪۹۳/۶۷) را به‌درستی شناسایی کند. علت منفی بودن پنج نمونه دیگر (٪۶/۳۳) با وجود کشت مثبت نمونه‌ها می‌تواند به‌علت عدم وجود ژن ETA بر روی DNA باکتری باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Robles-Price بر روی ژن‌های ویرولانس سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت مشخص شد که در ۳۶ سویه مورد بررسی با روش‌های آنالیز ژنتیکی پلاسمیدی و RAPID-PCR،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-25]

ژن‌های ویرولانس galD، ETA، exoS، nail و nal2 نقش موثری در پاتوژنز عفونت دارند.[۱۵]

Amini همسانه‌سازی جایگاه کاتالتیک ژن ETA سودوموناس آئروژینوزا را مورد بررسی قرار داده و نشان داد که ۹۰٪ باکتری‌های جداشده دارای ژن ETA هستند، این در حالی است که در مطالعه حاضر ۹۳/۶۷٪ باکتری‌های جداشده دارای این ژن بودند.[۱۲] برخی از مطالعات دیگر هم به شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با واسطه ژن ETA از طریق PCR پرداخته و حساسیت این روش را در تشخیص قابل اطمینان گزارش کرده‌اند که با نتایج ما نیز مشابهت دارد.[۸و۱۴]

Hummel به بررسی حساسیت PCR با واسطه ژن اگزوتوکسین A در جهت تشخیص سودوموناس آئروژینوزا پرداخت و حساسیت و سرعت PCR در تشخیص را بسیار بالا گزارش کرد.[۱۶] در مطالعه‌ای دیگر نیز سودوموناس آئروژینوزا از طریق PCR از بیماران دچار CF با حساسیت بالا با واسطه این ژن شناسایی گردید.[۱۷] بنابراین نتایج مطالعه ما با سایر مطالعات همخوانی داشته که علت این موضوع نیز می‌تواند در این باشد که در اکثر سودوموناس آئروژینوزاهای ایزوله‌شده از بیماران دارای جراحت، عفونت مجاری ادراری، عفونت‌های دستگاه تنفسی و در سرم بیماران CF عفونی‌شده با سودوموناس آئروژینوزا ژن ETA نمایان شده است.[۸و۹] با توجه به حساسیت بالای PCR در شناسایی این ژن طبق مطالعات قبلی و همچنین مطالعه حاضر، استفاده از این روش با واسطه این ژن می‌تواند روشی حساس و در عین حال سریع در شناسایی این میکروارگانیسم تلقی گردد. در ضمن این روش می‌تواند جایگزین روش‌های تشخیصی شایع امروزی قرار گیرد.

از مزایای مطالعه ما نسبت به مطالعات مشابه حجم بیشتر نمونه می‌باشد با این وجود فاکتورهای زیادی مثل حضور بازدارنده‌های PCR در نمونه، شناسایی سلول‌های زنده و غیره زنده، اختصاصیت آغازگر، شناسایی مستقیم یا استفاده از مراحل غنی‌کننده می‌توانند حساسیت یک روش شناسایی PCR را تحت تاثیر قرار دهند. پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آینده ضمن استفاده از حجم نمونه بیشتر، از سویه‌های این میکروارگانیسم در مناطق دیگر و همچنین از فاکتورهای ویرولانس دیگر هم به‌طور همزمان استفاده گردد چرا که بررسی چند فاکتور ویرولانس به‌طور همزمان ممکن است حساسیت بسیار بالاتری از PCR را در شناسایی این باکتری نمایان سازد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی فراوانی ژن اگزوتوکسین A و حساسیت روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۰ و کد ۱۶/۳۵/۲۱۶۴/پ/د می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان اجرا شده است.

References

1. Wolf P, Elsässer-Beile U. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *Int J Med Microbiol* 2009;299(3):161-76.
2. Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of Pseudomonas aeruginosa. *Biochimie* 2002;84(5-6):499-510.
3. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs* 2007;67(3):351-68.
4. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a hospital from a rural area. *Indian J Med Res* 2005;121(5):701-3.
5. O'Carroll MR, Syrmis MW, Wainwright CE, Greer RM, Mitchell P, Coulter C, et al. Clonal strains of Pseudomonas aeruginosa in paediatric and adult cystic fibrosis units. *Eur Respir J* 2004;24(1): 101-6.
6. Tramper-Stranders GA1, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005;4 Suppl 2:37-43.
7. Joshi BH, Puri RK. Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and Pseudomonas exotoxin in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 2005;39(2):189-98.
8. Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify Pseudomonas aeruginosa and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2003;41(9):4312-7.
9. Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS. Early detection of Pseudomonas aeruginosa: Comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004;3:21.
10. Xiao X, Zhang J, Gong J, Pan Y, Yu Y, Yang X, et al. Rapid detection of Pseudomonas aernginosa by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targetting ETA gene. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2008;24(4):581-5.
11. Nikbin VS, Aslani MM, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour GH. Molecular identification and detection of

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-25]

virulence genes among Pseudomonas aeruginosa isolated from different infectious origins. *Iran J Microbiol* 2012;4(3):118-23.
12. Amini B, Kamali M, Zarei Mahmod Abadi A, Mortazavi Y, Ebrahim Habibi A, Bayat E, et al. Cloning of catalytic domain of exotoxin a from pseudomonas aeruginosa. *ZUMS J* 2010;18(71):24-33.
13. Kolak J, van Saene HK, de la Cal MA, Silvestre L, Peric M. Control of bacterial pneumonia during mechanical ventilation. *Croat Med J* 2005;46(2):183-96.
14. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. *Clin Microbiol Infect* 2005;11 Suppl 4:17-32.
15. Robles-Price A, Wong TY, Sletta H, Valla S, Schiller NL. AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 2004;186(21):7369-77.
16. Hummel A, Unger G. Detection of Pseudomonas aeruginosa in bronchial and tracheal aspirates by PCR by amplification of the exotoxin A gene. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1998;201(4-5):349-55.
17. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2004;42(5):2074-9.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-25]

TUMJ Tehran University Medical Journal, June 2014; Vol. 72, No. 3: 167-173 Original Article

Evaluation of exotoxin A gene and frequency of polymerase chain reaction sensitivity in detection of pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients

Rasoul Yousefi Mashouf Ph.D.[1]
Rasoul Esmaeili[2*]
Mohammad Yousef Alikhani Ph.D.[1]
Mehdi Ghanbari M.Sc.[1]

1- Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
2- Medical Student, Student's Research Committee, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Student's Research Committee, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Shahid Fahmideh St., Hamadan, Iran.
Tel: +98-811-8380454
E-mail: r.esmaeili@umsha.ac.ir

Abstract

Received: 01 Jan. 2014 Accepted: 04 Mar. 2014 Available online: 05 May. 2014

Background: Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative pathogens opportunism which causes severe infections in human beings. The most common infection include: endocarditis, meningitis, septicemia and chronic lung infections in cystic fibrosis patients. This bacterium has many pathogenic factors including; exotoxin A, lipopolysacharide, phospholipase C, pili, elastase and alkaline protease. The purpose of this study was to evaluate the frequency of exotoxin A gene (ETA) as a strong virulence factor and sensitivity determination of polymerase chain reaction (PCR) in pseudomonas aeruginosa isolated from second and third-degree burn patients.

Methods: This study has performed in Besat University Hospital in Hamadan from January to December 2012. We used 170 isolated samples. The samples were isolated from blood and skin biopsy in second and third-degree burn patients. We had 79 strains positive culture of pseudomonas aeruginosa. Forward and reverse primers used for PCR were designed by DNASIS and Oligo software. Then genomic of known strains were extracted by DNA purification kit and indentified by PCR. The quality and quantity of the extracted DNA was determined using spectrophotometry. For determination of PCR sensitivity was used culture test as gold standard. DNA of pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) was used as a positive control. Finally data was analyzed using SPSS software.

Results: Out of 170 isolated samples, 79 strains of pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients had positive culture. PCR of isolated positive culture demonstrated that 5 strains (6.33%) were with out this virulence factor and 74 strains (93.67%) had ETA gene. So the sensitivity of test based on sensitivity formula was 94.04%.

Conclusion: Our results showed that sensitivity of PCR mediated ETA gene in detection of pseudomonas aeruginosa strains is considerable and this factor can be used as a good factor identifying of pseudomonas aeruginosa. It seems more studies with larger sample size is necessary in this area.

Keywords: burns, exotoxin A, polymerase chain reaction, pseudomonas aeruginosa.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-25]