مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۸، آبان ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تعیین شیوع ژن‌های بیماری‌زا در ایزوله‌های سودوموناس ائروژینوزا جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های ارومیه

غزال اشرفی: کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه آزاد ارومیه، ارومیه، ایران

پریسا برزگر معصومی: کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه آزاد ارومیه، ارومیه، ایران

مریم پروینی کهنه شهری: گروه زیست شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران (*نویسنده مسئول) m.parvini@iaurmia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از پاتوژن‌های گرم منفی، غیر تخمیری، کاتالاز مثبت است که باعث عفونت‌های مهم بیمارستانی نظیر عفونت مجاری ادراری، پنومونی، سپتی سمی می‌گردد. این باکتری نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاوم می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی شیوع ژن *bla*-SHV و CTX –M و تعیین فراوانی ژن‌های Exo A و Exo S در *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های ارومیه می باشد.

روش کار: در این مطالعه توصیفی – مقطعی، ۱۰۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی خون، زخم، تراشه و ادرار بیماران بستری در بیمارستان‌های مختلف ارومیه جمع آوری شد. بعد از تایید باکتری با تست‌های بیوشیمیایی، تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک انجام شد. شیوع ژن‌های مورد مطالعه با روش PCR استاندارد و touchdown-PCR تعیین شد.

یافته ها: نتایج حاصل از تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی، به میزان ۶۳٪ مقاومت به ژن‌های بتالاکتاماز و اگزوتوکسینی را نشان داد. بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، به میزان ۸۶٪ و کمترین مقاومت نسبت به کلیستین، به میزان ۳٪ بود. فراوانی ژن‌های CTX-M و *bla*-SHV و Exo S و Exo A در نمونه‌های مورد مطالعه، به ترتیب ۹۳٪ /۷، ۴/۷۶٪، ۵۲/۳۸٪ و ۵۷/۱۴٪ بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر شیوع پایینی از ژن‌های CTX-M و bla-SHV را در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد. با توجه به اهمیت وجود سویه‌های مولد بتالاکتاماز و اگزوتوکسینی در بیمارستان‌ها، شناسایی سریع این سویه‌ها می‌تواند گامی مهم و اساسی در درمان و کنترل عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها به شمار رود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

سودوموناس آئروژینوزا،
فراوانی ژن‌ها،
مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۱۱

تاریخ چاپ: ۹۹/۰۸/۱۱

شیوه استناد به این مقاله:

Ashrafi Gh, Barzegar Masoomi P, Parvini Kohneh Shahri M. Determination of the prevalence of pathogenic genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Patients hospitalized in Urmia Hospitals. Razi J Med Sci. 2020;27(8):54-64.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

Razi Journal of Medical Sciences. 2020;27(8):54-64. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Determination of the prevalence of pathogenic genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Patients hospitalized in Urmia Hospitals

Ghazal Ashrafi: Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
Parisa Barzegar Masoomi: Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
Maryam Parvini Kohneh Shahri: Assistant Professor, Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia ,Iran (*Corresponding author) m.parvini@iaurmia.ac.ir

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic, gram-negative, non-fermented and catalase-positive pathogen that causes significant opportunistic infections such as urinary tract infection, pneumonia, and septicemia. *P. aeruginosa* is a unique bacteria that can make changes in the virulence genes expression and the rate of drug resistance in order to survive in different environments. Drug resistance resulting from beta-lactamases have been reported to be an important cause of various infections and are a critical therapeutic problem worldwide. Additionally, It has been reported that the clinical isolates of *P. aeruginosa* are challenging to treat because of their virulence factors and antibiotics resistances. This bacteria has a large number of pathogenic agents such as Exotoxin A, Exoenzyme S and Elastase, which causes resistance of bacteria against antibiotics. They are resistant to many antibiotics, including beta-lactams and third-generation cephalosporins. The objective of this study was to determine the prevalence of Exo A, and Exo S genes in clinical isolates of *P. aeruginosa* obtained from patients hospitalized in Urmia city hospitals. The other aim of this study was to evaluate the antibiotic resistance, and the prevalence of bla-SHV and CTX-M genes in clinical isolates of *P. aeruginosa* obtained from patients hospitalized in Urmia city hospitals.

Methods: Through this cross-sectional and experimental-applied study, one-hundred isolates of *P. aeroginosa* from diverse clinical sources, including blood, wound, trachea and urine samples, were collected from different Urmia city hospitals, Iran. The hospitals and private or public laboratories were included Motahari, Imam-Reza, Arian, Taleghani, Milani, Imam-Khomeini, and Arefian. Samples were incubated and cultured in a nutrient agar culture medium at 37°C for 24 hours, and then a slide of each sample was prepared for examination by Gram Staining. Biochemical tests were performed on the samples suspected of *P. aeruginosa* including catalase, oxidase, oxidation/ fermentation test, pigment production, arginine dehydrolase, and growth at 42°C. Approved samples were cultured on a Mueller-Hinton agar culture medium to evaluate drug resistance. After confirmation by biochemical tests, antibiotic susceptibility test was performed using the disk diffusion method. The disks were placed at regular distances on the plates' surface, and the size of the zone of inhibition was measured after 24 hours of incubation at 37 °C. CLSI reference tables were used to detect the rate of antibiotic resistance. The antibiotic disks used in this study were included: antibiotics from the family of aminoglycosides (gentamicin, ceftriaxone, imipenem, cefotaxime, colistin and amikacin) and the β-lactam family (ceftazidime), and ciprofloxacin. In order to determine the prevalence of Exo A, Exo S, *bla*-SHV and CTX –M genes, DNA of the samples was extracted using the boiling method and maintained in the TE buffer in 20°C for PCR reaction. The primer sequences of the desired genes were obtained from the valid articles to perform the PCR reaction. PCR cycles were optimized, and the

Keywords
Pseudomonas aeruginosa,
Gene prevalence,
Antibiotic Resistance and susceptibility

Received: 01/08/2020
Published: 01/11/2020

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

prevalence of genes was determined using the standard PCR method and touchdown-PCR.
PCR reaction was performed at a standard volume of 25 µl. In this volume, for each microtubule, a mixture of 1 µl of extracted DNA samples, one µl of each forward and reverse primers, 12.5 µl of Master Mix and 9.5 µl of deionized distilled water were mixed. Then the PCR reaction was performed in a thermocycler with a specific time and heat cycle for amplification of each gene as follows: For the Exo A gene, the first temperature range includes an initial cycle of denaturation at 95 °C for two minutes, repetition of 14 cycles for denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing temperature at 73/1 °C for 30 seconds, through which the temperature decreases half a degree at each cycle, the extension temperature at 72 °C for 40 seconds. The second temperature cycle was included the denaturation at 95 °C for 30 seconds that be repeated for 19 cycles, the annealing temperature at 66.1°C for 30 seconds and the extension temperature at 72°C for 40 seconds and a final expansion cycle at 72 ° C for 40 seconds. For Exo S, bla-SHV and CTX-M genes, the temperature program was one cycle of initial denaturation at 95 ° C for two minutes, denaturation temperature at 95 °C for 30 seconds was repeated for 25 cycles, the annealing temperatures were 64°C, 61 °C and 56.7 °C respectively for 30 seconds, the extension temperature at 72 °C for 50, 70 and 80 seconds, respectively, and a final extension cycle at 72 °C for five minutes for each gene. Finally, in order to qualify the PCR product, five microliters of each sample were transferred for electrophoresis on 2% agarose gel and finally stained with ethidium bromide. The obtained data were analyzed by the qualitative method as a percentage.
Results: In this descriptive cross-sectional study, from 100 samples collected from different hospitals, 24 samples were obtained from the male patients (24%), and 76 samples were obtained from the female patients (76%). Clinical samples prepared from patients included 10% wounds, 4% blood and 86% urine. The antibiotic susceptibility test results indicated about 63% of resistance to β-lactamases and exotoxin genes. The highest resistance was to cefotaxime, 86%, and the lowest resistance rate was to colisitin, 3%. The other antibiotics' resistance rates were 28% for gentamicin, 61% for ceftriaxone, 28% for amikacin, 23% for ceftazidime, 24% for ciprofloxacin, and 30% for imipenem. PCR results showed 52/38% and 57/14% of the isolates contained exotoxin S and A genes, respectively. Positive genes of CTX-M and bla-SHV were detected in 7.93% and 4.76% of isolates, respectively.
Conclusion: The presence of genes encoding beta-lactamase and exotoxin enzymes and their transmission among gram-negative bacteria is a principal threat for consumers of broad-spectrum cephalosporins, especially when indiscriminate using these antibiotics. In recent decades, the emergence of resistant strains of this bacterium with multiple drug resistance has increased. Therefore, isolation and identification of *P. aeruginosa* from the clinical samples and reporting the results to health authorities is essential. The present study demonstrated a low occurrence of *P. aeruginosa* isolates carrying CTX-M and *bla*-SHV genes. Additionally, drug resistance and the presence of virulence factors such as exotoxins can be a severe warning for treatment centers in terms of control of disease caused by this bacterium.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Ashrafi Gh, Barzegar Masoomi P, Parvini Kohneh Shahri M. Determination of the prevalence of pathogenic genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Patients hospitalized in Urmia Hospitals. Razi J Med Sci. 2020;27(8):54-64.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

مقدمه

یکی از رایج‌ترین دلایل عفونت‌های بیمارستانی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginos*) می‌باشد. این باکتری یکی از پاتوژن‌های گرم منفی، هوازی، فرصت طلب و دارای تاژک می‌باشد که در اغلب بیماران بستری بخصوص بیماران دچار سوختگی شدید یا بیماران با نقص سیستم ایمنی می‌تواند عفونت‌های شدید پس از سوختگی، ادرار، زخم و خون را ایجاد کند (۱). این باکتری هم‌چنین یک فاکتور موثر در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس می‌باشد که موجب سرطان و سایر بیماری‌ها نیز می‌گردد (۲). بیماریزایی این باکتری به دلیل وجود یک ژنوم بزرگ است که حاوی عوامل ویرولانس متعدد است (۳). کاستن از نفوذ پذیری غشای خارجی، وجود پمپ‌های افلاکس، تولید اگزوتوکسین‌ها و ترشح آنزیم‌های بتالاکتامازی از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم در *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد (۴).

آنزیم‌های بتالاکتاماز با هیدرولیز حلقه اکسی ایمینو بتالاکتام‌ها از قبیل پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها باعث غیر فعال شدن این آنتی بیوتیک‌ها و ایجاد مقاومت در برابر آن‌ها می‌شوند. از جمله بتالاکتامازها *bla*-SHV و CTX-M می‌باشد که توسط ژن‌های پلاسمیدی کد می‌شوند(۵).

سموم تولید شده توسط باکتری‌های بیماری‌زا نیز می توانند موجب تداخل عملکردهای فیزیولوژیکی سلول‌ها شده و کشنده باشند(۶). در بین توکسین‌های خارج سلولی، EXO A سم اصلی تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* است که نقش اصلی را در ویرولانس باکتری دارد و توسط سیستم ترشحی نوع II در فاز رکود باکتری به فضای خارج سلولی ترشح می‌شود (۷و۸). ترشح این توکسین طی زمان رشد باکتری تابع عوامل مختلف مانند درجه حرارت محیط، غلظت آهن و حضور اسید آمینه گلوتامین می‌باشد (۹). مطالعات کلینیکی نشانگر آن است که Exo A عامل اصلی بیماری زایی *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران دارای جراحت، عفونت مجاری ادراری، عفونت‌های دستگاه تنفسی و بیماران سیستیک فیبروزیس عفونی شده با این باکتری است (۱۰ و ۱۱). Exo S یک نوع سیتو توکسین است که در کلونیزه شدن باکتری نقش دارد و عامل اصلی بیماری زایی در عفونت‌های سوختگی است (۱۲ و ۱۳).

با توجه به اینکه شیوع بالا، ایجاد عفونت‌های شدید و افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها بخصوص نسل سوم سفالوسپورین ها از مشکلات اصلی این باکتری در بحث درمان می‌باشد، این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم از طریق تعیین فراوانی ژن‌های *bla*-SHV، CTX-M، Exo A و Exo S در سویه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد.

روش کار

در این مطالعه‌ی مقطعی- توصیفی، بعد از دریافت کدهای اخلاق IR.IAU.URMIA.REC.1399.042 و IR.IAU.URMIA.REC.1399.043 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد ارومیه، تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی شامل ادرار، زخم، سوختگی و خون از اسفند ماه ۱۳۹۶ تا تیر ۱۳۹۷ جمع آوری شدند. نمونه‌ها ابتدا در آزمایشگاه بیمارستان‌های مورد مطالعه (مطهری، طالقانی، آذربایجان و امام رضا) بر روی دو محیط پایه‌ی بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس جهت تشخیص و تایید نهایی وجود باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، تست‌های بیوشیمیایی متعدد شامل کشت بر روی محیط TSI، تست اکسیداز کاتالاز، تست OF، رشد در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و بررسی رشد در محیط ستریمید آگار انجام شد. به منظور نگهداری طولانی مدت باکتری‌ها، برخی نمونه‌ها در محیط نوترینت براث کشت و نگهداری شدند.

تست تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از ۸ دیسک آنتی بیوتیکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم رایج (شرکت *Mast* انگلستان) شامل جنتامایسین، سفتریاکسون، آمیکاسین، ایمی‌پنم، سفوتاکسیم، کلیستین، سفتازیدیم و سیپروفلاکساسین با استفاده از روش انتشار دیسک دیفیوژن و بر براساس دستورالعمل ۲۰۱۸ موسسه‌ی استاندارد های بین المللی CLSI انجام شد و بر روی محیط کشت مولر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌ها در فواصل منظم روی سطح پلیت‌ها قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله های عدم رشد به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری شد.

برای اثبات وجود ژن‌های مورد نظر از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) استفاده گردید. استخراج DNA به روش Boiling صورت گرفت. به این منظور نمونه هایی که در آزمون فنوتیپی به هر یک از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم بودند، در محیط نوترینت آگار به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. در مرحله‌ی بعد ترکیبی به نام لیز بافر شامل ۰/۵ گرم SDS و ۰/۴ گرم NaOH تهیه شد و با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط گردید. سپس با سوآب کلنی کوچکی از باکتری‌ها برداشته و در ۲۰ میکرولیتر از این بافر در داخل میکروتیوپ ها بطور کامل حل شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه ی سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه، محلول رویی دور ریخته شد. در نهایت بر روی رسوب باقی‌مانده حاوی DNA، ۱۸۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد.

برای شناسایی مولکولی و اثبات وجود ژنهای هدف مطالعه در باکتری‌هایی که فنوتیپ ESBL آنها مثبت گزارش شده بود از روش PCR استفاده شد. در این تحقیق برای ژن‌های *bla*-SHV، CTX-M و اگزوتوکسین S از PCR ساده و برای اگزوتوکسین A به دلیل اختلاف دمایی بیشتر از ۳ واحد در پرایمرها از TOUCH DOWN PCR استفاده شد (۱۴).

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق و ویژگی‌های دمایی آن‌ها در جدول ۱ ذکر شده است. واکنش PCR برای بررسی هریک از ژن‌ها با شرایط برقراری واکنش در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این حجم برای هر میکروتیوپ، مخلوطی از ۱ میکرولیتر نمونه DNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مخلوط و به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با سیکل زمانی و حرارتی اختصاصی برای تکثیر هر ژن به شرح زیر انجام گرفت:

برای ژن Exo A، بازه دمایی اول شامل یک سیکل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت دو دقیقه، تکرار ۱۴ چرخه برای واسرشت در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۷۳/۱ به مدت ۳۰ ثانیه که این دما به ازای هر چرخه نیم درجه کاهش می‌یابد، دمای گسترش ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، و بازه دمایی دوم شامل تکرار ۱۹ چرخه واسرشت در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۶/۱ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای گسترش ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی با دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد.

برای ژن‌های Exo S، *bla*-SHV و CTX-M نیز برنامه دمایی به‌صورت یک چرخه واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت دو دقیقه، تکرار ۲۵ چرخه برای واسرشت در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال به ترتیب ژن‌ها شامل ۶۴، ۶۱ و ۵۶/۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای گسترش ۷۲ درجه به

جدول ۱- توالی و مشخصات آغازگرهای ژن‌های Exo S، Exo A، bla-SHV و CTX-M

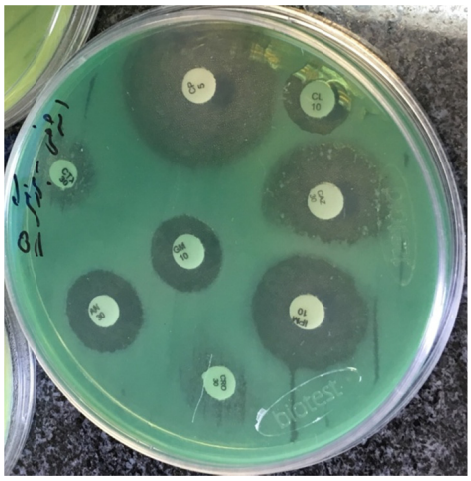
NO.	ژن هدف	Seq.(۵′-...-۳′)	منبع	دمای اتصال (°C)	طول محصول (bp)	Tm (°C)
۱	Exo S	(F):CGTCGTGTTCAAGCAGATGGTGCTG	۱۵	۶۴	۴۴۴	۶۲/۷
		(R):CCGAACCGCTTCACCAGGC				۶۰/۲
۲	Exo A	(F):GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC	۱۶	۷۲	۳۹۶	۶۴/۳
		(R):CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT				۶۷/۸
۳	*bla*-SHV	(F):AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	۱۷	۵۶/۷	۷۱۳	۵۲/۷
		(R):ATCCCGCAGATAAATCACCAC				۵۴/۷
۴	CTX-M	(F):TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	۱۸	۶۱	۶۸۸	۵۴/۲
		(R):CGATATCGTTGGTGGTRCCAT				۵۴/۷

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

ترتیب به مدت ۵۰، ۷۰ و ۸۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی با دمای ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه برای هر ژن انجام شد. به منظور بررسی محصول PCR، پنج میکرولیتر از آن جهت الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪ انتقال داده شد و در نهایت با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

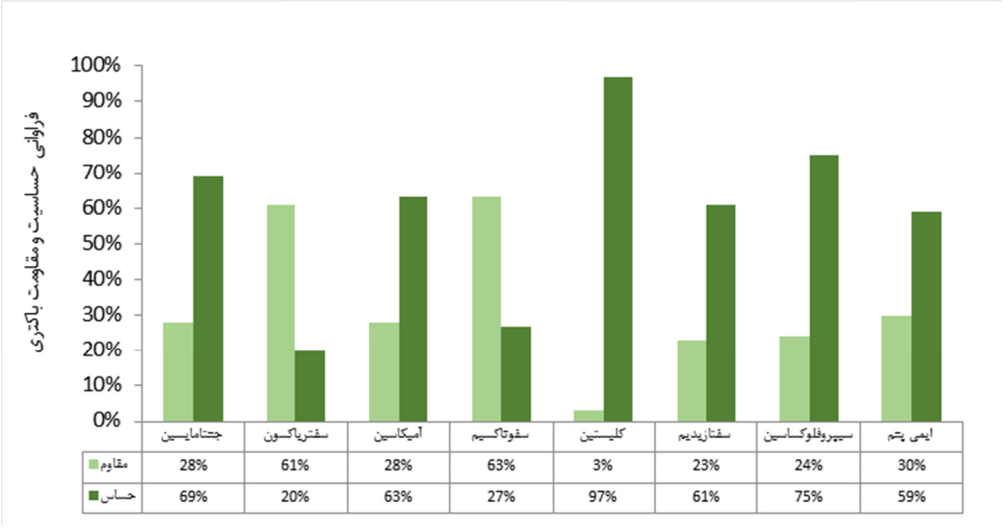
در این مطالعه توصیفی - مقطعی، از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده از بیمارستان‌های مختلف، ۲۴ نمونه از بیماران مرد (۲۴٪) و ۷۶ نمونه از بیماران زن (۷۶٪) تهیه شده بودند. نمونه های بالینی تهیه شده از بیماران شامل ۱۰٪ زخم، ۴٪ خون و ۸۶٪ ادرار بود. طبق نتایج آنتی‌بیوگرام و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد(شکل ۱)، از ۱۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* ۶۳ ایزوله (۶۳٪) مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مورد نظر بودند که از این ۶۳ ایزوله، ۱۰ نمونه مربوط به زخم (۱۵/۸۷٪)، ۳ نمونه مربوط به خون (۴/۷۶٪) و ۵۰ نمونه مربوط به ادرار (۷۹/۳۶٪) بود. بیشترین میزان مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیک سفوتاکسیم با فراوانی ۶۳٪ و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک کلیستین با فراوانی ۳٪ گزارش شد. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر نیز شامل جنتامایسین (۲۸٪)، سفتریاکسون (۶۱٪)، آمیکاسین (۲۸٪)، سفتازیدیم (۲۳٪)، سیپروفلاکساسین (۲۴٪) و ایمی پنم (۳۰٪) بود (نمودار ۱).



شکل ۱- هاله عدم رشد نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم (جنتامایسین،سفتریاکسون،آمیکاسین،سفوتاکسیم،کلیستین،سفتازیدیم،سیپرو فلاکساسین،ایمی پنم)

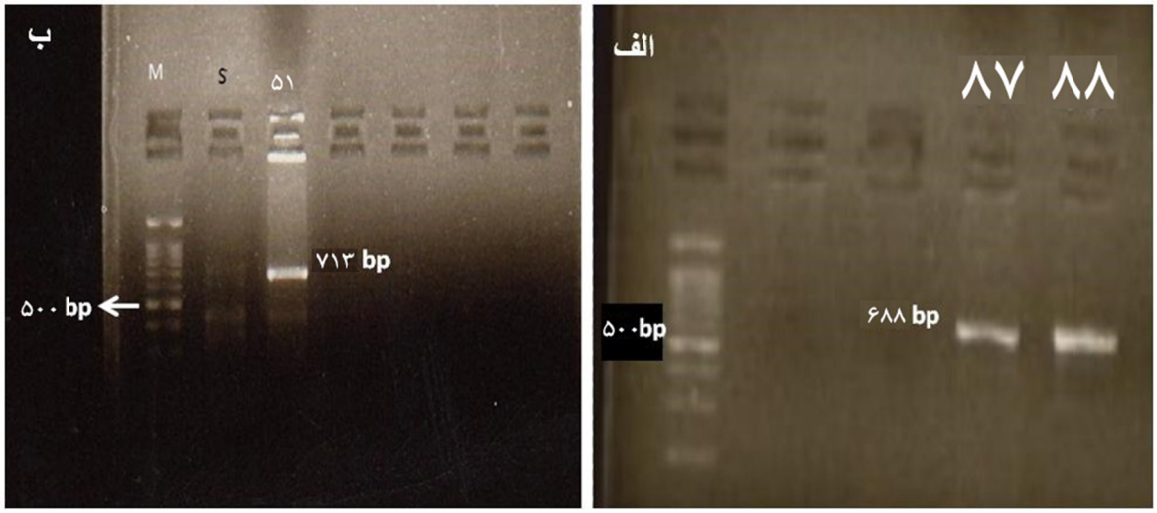
نتایج مولکولی بررسی شیوع ژن‌های CTX-M و *bla*-SHV در بین نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که از بین ۶۳ نمونه‌ی باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو، به ترتیب ۵ نمونه (۷/۹۳ درصد) و ۳ نمونه (۴/۷۶ درصد) نسبت به این ژن‌ها مثبت بودند(شکل ۲، نمودار ۲). نمونه‌های مثبت شامل زخم و ادرار بودند.

نتایج مولکولی بررسی شیوع ژن‌های اگزوتوکسینی نیز نشان داد که از بین ۶۳ نمونه‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو، تعداد ۳۶ نمونه

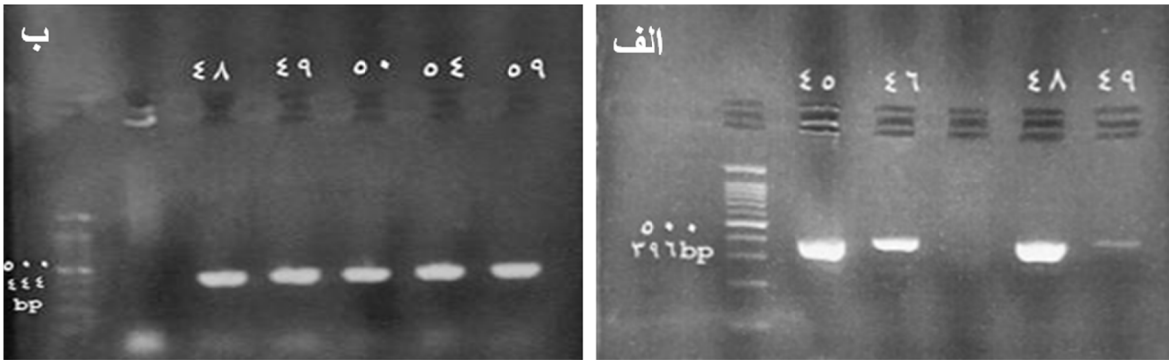


نمودار ۱- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم

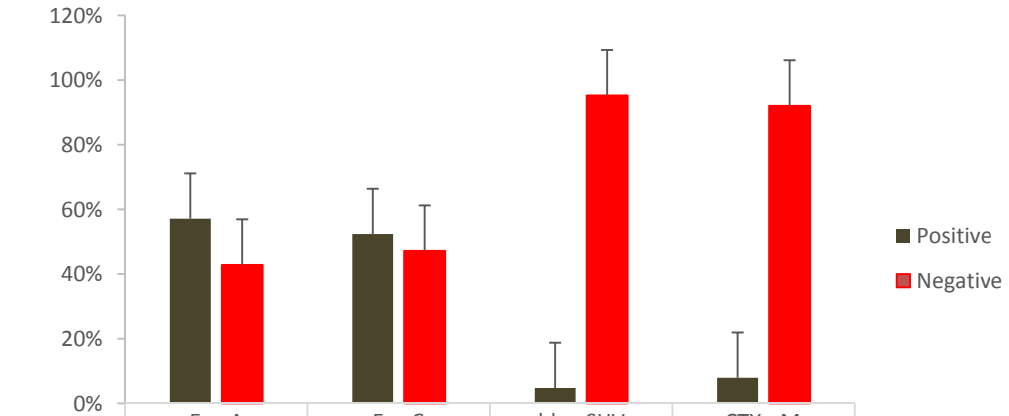
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]



شکل ۲- باند ۶۸۸ جفت بازی مربوط به ژن CTX-M نمونه‌ی ۸۷ ادرار، نمونه‌ی ۸۸ – زخم (الف) و باند ۷۱۳ جفت بازی مربوط به ژن *bla*-SHV نمونه‌ی ۵۱ – ادرار (ب).



شکل ۳- باند ۳۹۶ جفت بازی مربوط به ژن Exo A نمونه‌ی ۴۵ و ۴۶ ادرار، نمونه ۴۸ و ۴۹ زخم(الف) و باند ۴۴۴ جفت بازی مربوط به ژن Exo S نمونه ۴۸ و ۴۹ – زخم، نمونه ۵۰ و ۵۹ – ادرار و نمونه ۵۴ – خون (ب).



	Exo A	Exo S	bla - SHV	CTX - M
Positive	57.14%	52.38%	4.76%	7.93%
Negative	42.86%	47.17%	95.24%	92.07%

نمودار ۲- فراوانی حضور ژن‌های CTX-M , *bla*-SHV, Exo S, Exo A در نمونه‌های بالینی بر حسب درصد

(۵۷/۱۴٪) نسبت به ژن Exo A و تعداد ۳۳ نمونه بودند.
(۵۲/۳۸٪) نسبت به ژن Exo S مثبت بودند (شکل ۳، نمودار ۲). نمونه‌های مثبت شامل زخم، ادرار و خون

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل فرصت طلب و جدی در عفونت‌های بیمارستانی مانند سوختگی‌های شدید و بیماران دچار سیستیک فیبروزیس می‌باشد (۱۹). درمان بیماری‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* دشوار است. این امر به دلیل حضور فاکتورهای ویرولانس متعدد از جمله اگزوتوکسین‌ها در این باکتری است که از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای این باکتری به شمار می‌روند. وجود ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتامازی و اگزوتوکسینی و انتقال آن در بین باکتری‌های گرم منفی یک تهدید بزرگ برای مصرف کنندگان سفالوسپورین‌های با طیف وسیع به شمار می‌رود و مصرف بی رویه‌ی این آنتی بیوتیک‌ها در دهه‌های اخیر موجب افزایش ظهور سویه‌های مقاوم این باکتری با مقاومت چندگانه‌ی دارویی شده است (۲۳-۲۰). لذا جداسازی و شناسایی این باکتری از نمونه‌های بالینی و گزارش نتایج به مراجع بهداشتی حائز اهمیت است. Wolska و همکاران ویژگی‌های ژنتیکی ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* را از نظر حضور ژن‌های بیماری زا مطالعه کردند. در این پژوهش، دو ژن اگزوتوکسینی S و A بررسی شد که از بین ۴۹ جدایه، ۴۶/۱۵٪ دارای Exo S و ۷۶/۹٪ دارای ژن ExoA بودند (۲۴). در مطالعه حاضر، فراوانی ژن‌های اگزوتوکسینی Exo A و Exo S در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی تهیه شده از بیمارستان‌های ارومیه بررسی شد. از ۱۰۰ ایزوله جمع آوری شده، ۶۳ ایزوله مقاوم به آنتی بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم بودند که از بین ایزوله‌های مقاوم، ۵۷/۱۴٪ ایزوله‌ها دارای ژن Exo A و ۵۲/۸۳٪ ایزوله‌ها دارای ژن Exo S بودند. . علت منفی بودن سایر ایزوله‌ها می‌تواند به علت عدم وجود ژن‌های مورد نظر بر روی DNA باکتری باشد. مطالعات متعدد، فراوانی ژن Exo A را در عفونت‌های زخم، ۸۹٪ (۵)، ۹۰٪ (۲۵) و ۱۰۰٪ (۲۶) گزارش کردند. در مطالعه حاضر فراوانی این ژن در نمونه‌های زخم ۱۰۰٪ بود. در مقایسه با عفونت‌های زخم، فراوانی ژن Exo A در عفونت‌های خونی در این مطالعه ۳۳/۳۳٪ و در عفونت‌های ادراری ۶۹٪ بود. در مطالعه امیر مظفری و همکاران، ۸۱ ایزوله (۷۹/۴٪) Exo A+ بودند که از این میان، ۹۱/۴ درصد از نمونه های زخم و ۴۲/۱ درصد از نمونه های ادرار بودند (۲۷). در مطالعه‌ای که توسط آقایی و همکاران در سال ۹۴ انجام شد، طی بررسی ۱۲۰ ایزوله بیمارستانی، ۳۹ ایزوله (۲۹/۹٪) از نظر تولید اگزوآنزیم S مثبت بودند (۲۸). خرم روز و همکاران فراوانی این ژن را ۳۵/۸ درصد (۲۹) و جبل عاملی و همکاران نیز فراوانی این ژن را در نمونه‌های سوختگی ۲۹ درصد گزارش کردند (۳۰). این در حالی است که در مطالعه حاضر، ۵۲/۳۸٪ از نمونه‌ها دارای این ژن بودند که بیشترین درصد مربوط به نمونه‌های ادرار با فراوانی۵۲٪ بود. نتایج متفاوت در این مطالعات ممکن است به علت تفاوت در منابع جدایه‌ها یا تعداد نمونه گرفته شده باشد.

مقاومت به اکثر آنتی بیوتیک‌ها نظیر کینولون‌ها، فلورکینولون‌ها و بتالاکتام‌ها در سویه‌های تولیدکننده *ESBL* بیشتر از سویه‌های فاقد *ESBL* است (۳۱). افزایش مصرف داروهای بتالاکتام وسیع الطیف و بستری طولانی مدت بیماران سبب گسترش باکتری‌های تولیدکننده ی *ESBL* می‌شوند. در مطالعه‌ی حاضر که در سال ۱۳۹۷ در ارومیه انجام شد، ۶۳٪ از سویه‌های ایزوله شده تولید کننده‌ی بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. این در حالی است که همین رقم در اصفهان در سال ۱۳۹۰، برای نمونه های سوختگی ۲۳/۳٪ (۳۲) و در اهواز در سال ۱۳۹۴، ۱۷/۳٪ بود (۳۳). در مطالعه تفتی و همکاران نشان داده شد که ۲۹/۵٪ از سویه‌ها بتالاکتاماز وسیع الطیف تولید می‌کردند (۳۴). در مطالعه دیگری در ایران، این مقدار ۶۰/۸٪ گزارش شد (۵). در مطالعات انجام شده در کشورهای دیگر از جمله هند، فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ۲۵/۱۳٪ (۳۵) و ۱۳/۶٪ (۳۶) و در مصر، ۷/۴٪ گزارش شد (۳۷). CTX-M و *bla*-SHV از مهم‌ترین آنزیم‌های مرتبط با *ESBL* هستند که تاکنون شناخته شده‌اند. آنزیم CTX-M، آنتی بیوتیک سفوتاکسیم را غیر فعال می‌کند (۳۸). در مطالعات متعدد انجام شده، فراوانی این ژن ۱۴/۳٪ (۳۹)، در شیراز ۱۵/۵٪ (۴۰)، در اهواز ۲۱/۱٪ (۳۳) و در زاهدان ۲۲/۴٪ (۴۱) گزارش شده است. در این تحقیق، فراوانی ژن‌های CTX-M و *bla*-SHV به ترتیب ۱۸٪ و ۱۴ ٪ بود. در مطالعه ایمانی فولادی و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

همکاران، فراوانی ژن *bla*-SHV ۳۷/۵٪ گزارش شد (۴۲)، در حالی که در مطالعه بر روی سایر باکتری‌ها از جمله در انتروباکتریاسه‌ها، فراوانی ژن SHV ۷۴/۳٪ (۴۳)، در *کلبسیلا پنوموتیا*، فراوانی این ژن ۳۵/۲٪ و در *E. coli*، ۱۶/۲٪ بود (۴۴).

بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در این مطالعه مربوط به آنتی بیوتیک سفوتاکسیم ۶۳٪ و کمترین درصد مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک کلیستین ۳٪ بود. در مطالعه صورت گرفته توسط خرم روز و همکاران بر روی ۹۵ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سفپیم (۹۶/۸) بوده است (۲۹). در مطالعه جابل عاملی و همکاران که بر روی ۹۶ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سفتریاکسون به میزان ۱۰۰درصد و آمیکاسین، سفپیم، سفوتاکسیم، جنتامایسین به میزان ۹۰ درصد گزارش شد (۳۰). در مطالعه آذرگون و همکاران بر روی ۵۱ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا*، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به جنتامایسین، آمیکاسین و سفپیم به ترتیب ۳۷، ۲۱/۵ و ۲۱/۵ درصد و کمترین مقاومت به سفتازیدیم و ایمپنم و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۹/۸، ۱۳/۷ و ۱۵/۷ درصد گزارش شد (۴۵).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این تحقیق همانند سایر تحقیقات انجام شده در دیگر نقاط جهان بیان‌گر این است که سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *سودوموناس آیروژینوزا* در حال افزایش است و تولید بتالاکتاماز و اگزوتوکسین یکی از دلایل این امر می‌باشد. بررسی و تشخیص سریع این آنزیم‌ها در باکتری‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم هم از لحاظ اپیدمیولوژیک و هم به منظور کمک به پزشکان معالج در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان موفق بیماران و نیز برای کنترل سویه‌های مقاوم به داروها و جلوگیری از انتشار چنین عفونت‌هایی در بیمارستان‌ها لازم به نظر می‌رسد.

References

1. Finlayson EA, Brown PD. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and nonpigmented Pseudomonas aeruginosa. West Indian Med J. 2011;60(1):24-32.
2. Kipnis E, Sawa T, Kronish JW. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Méd malad infect. 2006; 36: 78–91.
3. Lyczaka JB, Cannonb CL, Piera GB. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2000; 2: 1060-1051.
4. 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. Glob Vet. 2011; 6(1): 61-72.
5. Farzali Shirehjini F, Amini K, Fatahi H. Identification of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM genes in pseudomonas aeruginosa strains isolated from human and animal samples using Multiplex-PCR method. Qom Univ Med Sci J. 2017;10(11):51-60.
6. Tokajian S, Timani R, Issa, Araj NG. molecular characterization, multiple drug resistance, and virulence determinants of Pseudomonas aeruginosa isolated from lebanon. Bri Microbiol Res J. 2012;2(4): 243-250.
7. Boncompte LF, Chapalain A, Chevalier S. Full virulence of Pseudomonas aeruginosa requires OprF. Infect Immun. 2011; 79(3): 1176–1186.
8. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U. Siderophoremediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa. PNAS. 2002; 99(10):7072–7077.
9. Badr RI, Nagdy M, Sabagh A, Bahaa A. Pseudomonas aeruginosa exotoxin A as a virulence factor in burn wound infections. Egypt J Med Microbiol. 2008; 17(1): 125-132.
10. Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of realtime 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.
11. 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.
12. Khodayary R, Nikokar I, Mobayen MR, Afrasiabi F, Araghian A, Elmi A, Moradzadeh M. High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in Pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian burn patients. BMC Res Notes. 2019; 12: 28.
13. Javanmardi F, Emami A, Pirbonyeh N, Keshavarzi A, Rajaee M. A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

acquired Pseudomonas aeruginosa isolates. Infect Genet Evol. 2019;75:104037

14. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nat Protocol. 2008;3(9):1452-6

15. Faraji F, Mahzounieh M, Ebrahimi A, Fallah F, Teymournejad O, Lajevardi B. Molecular detection of virulence genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. Microb Pathog. 2016; 99:1-4.

16. Verove J, Bernarde C, Bohn Y-ST, et al. Injection of Pseudomonas aeruginosa Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. PloS One. 2012;7:e30488.

17. Hamdy Mohammed S, Elsadek Fakhr A, Mohammed E Sayed H, Al Johery SA, Abdel Ghani Hassanein W. Spread of TEM, VIM, SHV, and CTX-M β-Lactamases in Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli Isolated from Egyptian Hospitals.. Int J Microbiol. 2016;2016:8382605

18. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2010;65(3):490-5.

19. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect. 2005; 4:17-32.

20. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001; 65(2): 232-260.

21. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med. 2010; 362(19): 1804-1813.

22. Paterson DL, Ko W-C, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. International prospective study of Klebsiella pneumoniae bacteremia: implications of extended-spectrum β-lactamase production in nosocomial infections. Ann Int Med. 2004;140(1):26-32.

23. Subha A, Ananthan S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among Klebsiella pneumoniae in Chennai. Indian J Med Microbiol. 2002; 20(2): 92-95.

24. Wolska K, Szweda P. Genetic features of clinical Pseudomonas aeruginosa strains. Pol J Microbiol. 2009;58(3):255-60.

25. 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. Iran J Microbiol. 2012;4(3): 118-123.

26. Chifiriuc MC, Cotar AL, Banu O, Lazar V. Molecular characterization of virulence patterns in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from respiratory and wound samples. Biointerface Research in Applied Chemistery, 2013; 3(2): 551-558.

27. 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

28. Aghaei SS, Javadi A, Sharifi Y, Morovvati A. Detection of exotoxin A, Y, T, U, S genes of Pseudomonas aeruginosa isolates resistant to third-generation cephalosporins in clinical samples of hospitalized patients in hospitals of Qom City, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2016;10(1):48-55.

29. Khoramrooz S, Rahbari N, Parhizgari N, Sharifi A, Yazdanpanah M, Gharibpour F, et al Frequency of type III Secretion System Cytotoxins - Encoding Genes among Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Patients. Zanjan Uni of med Sci, 2015; 23(99):52-63.

30. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P, etal. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Burns. 2012; 38(8): 1192-1197.

31. Kuralayanapalya SP, Patil SS, Hamsapriya S, Shinduja R, Roy P, Amachawadi RG. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria from animal origin: A systematic review and meta-analysis report from India. PLoS One. 2019;14(9):e0221771

32. Fazzeli H, Faghri J, Kabiri P, Fatahibafghi M, Arabestani MR. Identification of beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa with multiple antibiotic resistances. J Isfahan Med Sci. 2011;29(154):1365-74.

33. Alami A, Rahimi R, MeghdadiH. Determination of the frequency of CTX-M Gene in Extended Spectrum β Lactamases (ESBLs) producing pseudomonas aeruginosa in clinical samples in Ahvaz taleghani hospital, 2015 (Iran). Qom Univ Med Sci J. 2017;11(6):102-110.

34. Akhavan Tafti F, Zandi H, Vakli M, Mousavi M, Zarei M. Frequency of β-lactamase and metallo-β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn wounds in Yazd burn hospital during 2011-2012. FEYZ, 2014; 18(2): 167-74.

35. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Danish Rizvi SM, Kamal MA. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital. Saudi J Biol Sci. 2015;22(1):62-4

36. Ramalingam AJ, Santhanam L, Saikumar C, Illamani V. Detection of extended spectrum beta-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

lactamases in Pseudomonas aeruginosa isolates in a tertiary care hospital. J App Pharm Sci. 2015;5(5):80-2.

37. Zafer M, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, El-Din Ashour MS. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cancer patients. Biomed Res Int. 2014;2014:101635.

38. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657-86

39. Chen Z, Niu H, Chen G, Li M, Li M, Zhou Y. Prevalence of ESBLs-producing Pseudomonas aeruginosa isolates from different wards in a Chinese teaching hospital. Int J Clin Exp Med. 2015;8(10):19400-5.

40. Rabani Z, Mardaneh J. The antibiotics susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolates causing infections in Shahid Faghihi (Shiraz) hospital and idetify the strains harboring the blaCTX Gene. Armaghane-Danesh. 2015;20(8):689-705.

41. Bokaeian Mohmmad, Shahraki Zahedani S, Soltanian Bajgiran M, Ansari Moghaddam A. Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-M Genes in resistant strains of pseudomonas aeruginosa producing extended spectrum β-Lactamases. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(1):e13783.

42. Imani Foolad AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods. Ardabil J Med Sci. 2011;10(3): 189-198.

43. Tashi H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM and SHV-derived extended spectrum beta-lactamases in hospital based Enterobacteriaceae in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2005; 58(3):162-167.

44. Pishtiwan AH, Khadija KM. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M Genes among ESBL-Producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2019; 11(1): e2019041.

45. 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. Res Med. 2013;37 (3): 1890-1193.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]