View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۸، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۵/ ۵۶-۴۸

مقاله پژوهشی

جداسازی هم زمان ژن های حدت *gyrB, oprL, ETA* *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه های بالینی مراکز درمانی استان کرمان با روش PCR-Multiplex

آرزو کمالی[۱]، کیومرث امینی[*۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران؛ [۲] گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲

چکیده:

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* یک پاتوژن فرصت طلب و عامل عفونت های بیمارستانی و مرگ و میر به خصوص در بیماران با ضعف سیستم ایمنی می باشد و مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی منجر به مشکلاتی در درمان عفونت های آن می شود. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های حدت *سودوموناس آئروژینوزا* به روش Multiplex-PCR می باشد.

روش بررسی: ۶۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* شامل ۴۰ نمونه از کلکسیون آزمایشگاه میکروبیولوژی پاسارگاد و ۲۰ نمونه از بیمارستان های استان کرمان جمع آوری و در محیط های اختصاصی کشت داده و با آزمون های بیوشیمیایی تأیید شد. واکنش PCR بر روی تمامی نمونه ها برای شناسایی ژن های حدت ***gyrB, oprL, ETA*** و شناسایی جنس و گونه ***16SrDNA*** صورت گرفت.

یافته ها: از میان ۶۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا*، ۳۸ نمونه (۶۳/۳٪) دارای ژن ***gyrB*** و ***oprL***، ۳۷ نمونه (۶۱/۶٪) دارای ژن ***ETA*** و هر ۶۰ نمونه (۱۰۰٪) دارای ژن ***16SrDNA*** بودند.

نتیجه گیری: با توجه به اهمیت تشخیص سریع این باکتری به جهت بروز مقاومت و مشکلات موجود در روش های بیوشیمیایی، شناسایی همزمان چندین ژن با روش Multiplex-PCR به‌عنوان روشی حساس و دقیق در شناسایی این باکتری به شمار می رود.

واژه های کلیدی: Multiplex-PCR، ژن های حدت، *سودوموناس آئروژینوزا*.

مقدمه:

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت طلبی است که در تمام محیط ها قدرت زیست دارد. این باکتری به‌عنوان دومین باکتری بیماری زای رایج در جراحی ها و سومین عامل متداول عفونت های بیمارستانی است که حدود ۱۰٪ عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می دهد (۱). *سودوموناس آئروژینوزا* عامل عفونت های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت های بافت های نرم، باکتریمی، عفونت های استخوان و مفاصل، عفونت‌های معدی- روده ای، عفونت های سیستمیک متنوع به‌ویژه در بیماران با سوختگی‌های شدید، بیماران مبتلا به سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آن‌ها سرکوب شده است، می باشد (۳،۲). تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از تست‌های رایج در آزمایشگاه امکان‌پذیر است. روش های اولیه شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا* بیشتر بر مبنای خصوصیات فنوتیپی هستند و محصولات ژنی را شناسایی نمی کنند. این روش ها شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی ژنی است. از آن جا که

نویسنده مسئول: ساوه- واحد ساوه- دانشگاه آزاد اسلامی- گروه میکروبیولوژی- تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴، *E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017

این خصوصیات می توانند با تغییر شرایط خارجی، مرحله رشد و جهش های ژنتیکی تصادفی تغییر پیدا کنند، استفاده از آزمون های فنوتیپی گاه منجر به اخذ نتایج کاذب می شود. به علاوه ردیابی این باکتری در نمونه ها وقت گیر و حداقل ۴-۳ روز برای تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* نیاز است (۵،۴). به دنبال پیشرفت های جدید در روش‌های بیولوژی مولکولی، روش هایی که ژن های منحصر به فردی را در *سودوموناس آئروژینوزا* نشانه می گیرند، طراحی شده و *سودوموناس آئروژینوزا* را از سایر گونه ها متمایز می کنند. این روش ها بسیار دقیق تر هستند و کمتر نسبت به روش های فنوتیپی به تغییرات محیطی تحت تأثیر قرار می گیرند (۳). باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* دارای عوامل حدت متعددی می باشد. از مهم ترین عوامل حدت این باکتری اگزوتوکسین A (*ETA*) می باشد که یک پروتئین توکسیک است و توسط سویه های پاتوژن *سودوموناس آئروژینوزا* تولید می شود. اگزوتوکسین A که توسط ژن tox کد می شود، باعث اختلال در فاکتور طویل کننده (EF-2) در مرحله بیوسنتز پروتئین می شود. به نظر می رسد که اگزوتوکسین A عامل بیماری های سیستمیک ایجاد شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* باشد و باعث نکروز در محل تجمع باکتری و به‌عنوان عامل کمک کننده در تجمع باکتری باشد. به‌طوری که سویه‌های توکسین‌زا نسبت به سویه‌های غیر توکسینزا حدت بیشتری دارند (۶،۳). از دیگر عوامل حدت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مقاومت بالای این باکتری به آنتی بیوتیک ها می باشد که یکی از علل آن حضور پمپ های تراوشی (Efflux pump) در غشای خارجی این باکتری که به‌طور فعال موجب خروج دارو از سلول باکتری می شوند. ژن‌های متعددی در تشکیل پمپ‌های ایفلاکس حضور دارند که یکی از آن‌ها ژن *oprL* است. این ژن کد کننده لیپوپروتئین های پمپ ایفلاکس به شمار می رود (۷). *gyrB* کد کننده آنزیم توپوایزومراز ۲ می باشد. این ژن در *سودوموناس آئروژینوزا* دارای ساختار منحصر به فردی می باشد و از آن جهت تشخیص این گونه باکتریایی می توان استفاده کرد (۸). به‌علاوه موتاسیون های کروموزومی در این ژن مهم ترین دلیل مقاومت نسبت به فلوروکینولون هاست (۹). ژن *16SrDNA* یک مولکول DNA است که ۱۵۴۲ نوکلئوتید طول دارد. ویژگی آن وجود توالی های مکمل در داخل آن می باشد. این ژن دارای تمام ویژگی های مربوط به مطالعات فیلوژنی موجودات است. به این صورت که این ژن بین گونه ها منتقل نمی شود و ژن مورد مطالعه سطوح مناسبی از توالی حفاظت شده را دارا است.این ژن در طول تکامل تغییرات محدودی یافته است و برای ثبت اطلاعات تاریخی و تکاملی اندازه ای مناسبی دارد (۷). باتوجه به زمان‌بر بودن روش‌های تشخیص متداول امروزی در آزمایشگاه های تشخیصی و خطر جدی حضور این باکتری در مراکز درمانی به‌دلیل مقاوم بودن و باتوجه به اینکه عوامل حدت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* نشانگر مناسبی در جهت تشخیص سویه‌های دارای قدرت بیماری‌زایی بیشتر هستند، در این تحقیق سعی گردید که باتوجه به نکات ذکر شده و سرعت تشخیص با استفاده از روش Multiplex-PCR و شناسایی چند نوع میکروارگانیسم و یا چند نوع ژن به‌طور همزمان با ارائه نتایج این تحقیق به‌کارگیری آزمون‌های مولکولی تبیین گردد. هدف از انجام این تحقیق شناسایی دقیق و سریع ژن‌های *ETA*، *oprL*، *gyrB* و *16SrDNA* *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از روشMultiplex-PCR بوده است.

روش بررسی:

نمونه‌های انسانی مورد نیاز برای انجام این بررسی از پژوهش حاضر در قالب یک طرح توصیفی و مقطعی است. جهت جداسازی ژن های حدت نمونه های مختلف بالینی (۶۰ نمونه) ۴۰ نمونه از کلکسیون آزمایشگاه میکروبیولوژی پاسارگاد و ۲۰ نمونه از بیمارستان‌های استان کرمان جداسازی شد. این نمونه ها شامل: نمونه‌های زخم، ادرار و خون می باشد. این نمونه ها

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017

بر روی محیط‌های کشت مولرهینتون آگار به آزمایشگاه منتقل شدند و آزمایش های تشخیصی و تأییدی بر روی آن‌ها صورت گرفت. جهت تعیین هویت با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، تعیین شکل میکروسکوپی میکروارگانیسم، تست‌های کاتالاز، اکسیداز و سایر تست‌های بیوشیمیایی شامل تست سیمون سیترات، تولید H2S، تولید ایندول و تحرک، احیای نیترات، اوره آز، ترییل شوگرآیرون آگار، دکربوکسیلاسیون اورنیتین ولیزین، DNase و تست اکسیداتیو فرمنتاتیو انجام گرفت و باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی و تعیین هویت شده جهت تست های بعدی مورد بررسی قرار گرفت (۷). استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط کیت انجام شد. پرایمرهای *Pa16S*، *gyrB*، *oprL* و *ETA* جهت شناسایی ژن های *16SrDNA*، *gyrB*، *oprL* و *ETA* (ژن مربوط به تولید اگزوتوکسین) مطابق با جدول شماره ۱ مورد استفاده قرار گرفت. از آزمون Multiplex PCR جهت شناسایی این ژن‌ها استفاده شد. آزمایش در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱/۵ میلی مولارکلرید منیزیم، ۲۵۰ میکرومول از dNTP، ۰/۴ میکرومول از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن های حدت و ۱/۵ واحد از Taq پلی مراز و ۵ میکرولیتر DNA با غلظت (۱۰ نانوگرم) الگو انجام شد (۱۰،۸). شرایط سیکل حرارتی برای PCR بدین شرح بود: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۲۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه، مرحله ی بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به‌مدت ۱ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند. داده های آماری با نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

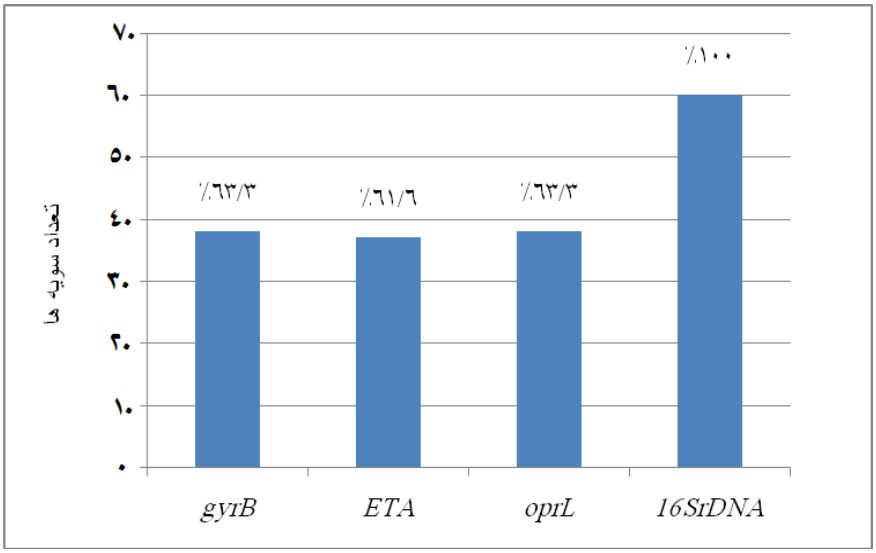
پرایمر	توالی پرایمر ('5 to 3')	ژن هدف	دمای اتصال (°C)	اندازه محصول (bp)
gyrB-F	**CCTGACCATCCGTCGCCACAAC**	***gyrB***		۲۲۲
gyrB-R	**CGCAGCAGGATGCCGACGCC**	***gyrB***	۵۸	۲۲۲
ETA-F	**GACAACGCCCTCAGCATCACCA**	***ETA***		۳۹۷
ETA-R	**CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCG**	***ETA***	۵۸	۳۹۷
oprL-F	**ATG GAAATGCTGAAATTCGGC**	***oprL***		٥٠٤
oprL-R	**CTTCTTCAGCTCGACGCGACG**	***oprL***	۵۸	٥٠٤
Pa16s-F	**GGGGGATCTTCGGACCTCA**	***16SrDNA***		٩٥٦
Pa16s-R	**TCCTTAGAGTGCCCACCCG**	***16SrDNA***	۵۸	٩٥٦

یافته ها:

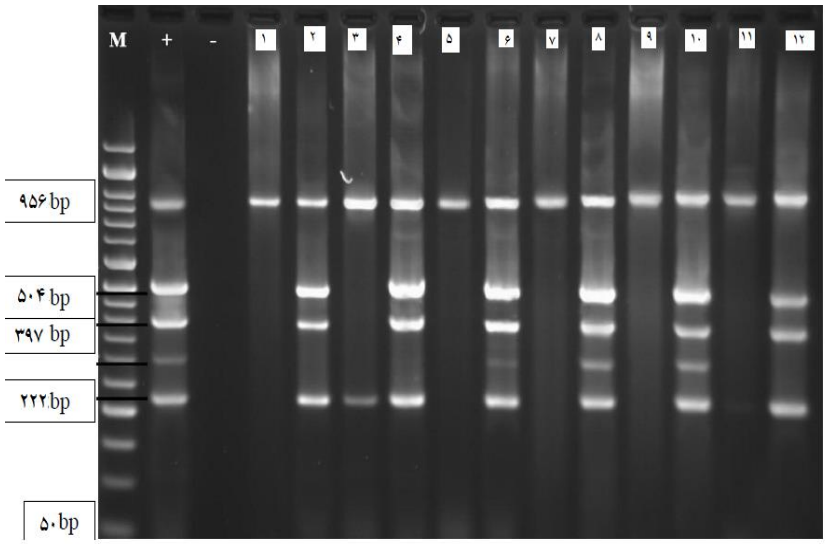
تمامی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی بررسی و مطابق با استانداردهای تشخیصی به‌عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* تأیید گردیدند؛ همچنین با استفاده از پرایمر اختصاصی تشخیص جنس و گونه مطابق با منبع مورد بررسی هر ۶۰ نمونه (۱۰۰٪) از نظر وجود ژن *16SrDNA* که تأیید کننده جنس و گونه *سودوموناس آئروژینوزا* بود، نیز تأیید نهایی شد. براساس آزمون PCR، از میان

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017

۶۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا*، ۳۸ نمونه (۶۳/۳٪) دارای ژن *gyrB*، ۳۷ نمونه (۶۱/۶٪) دارای ژن *ETA*، ۳۸ نمونه (۶۳/۳٪) دارای ژن *oprL* بوده که در نمودار شماره ۱ بر حسب تعداد و درصد بیان شده است. در تصویر شماره ۵-۱ نمونه‌های مورد بررسی بعد از انجام آزمون مولکولی و انتقال بر روی ژل آگارز با طول باند هریک از ژن ها به تفکیک مشخص گردیده است.



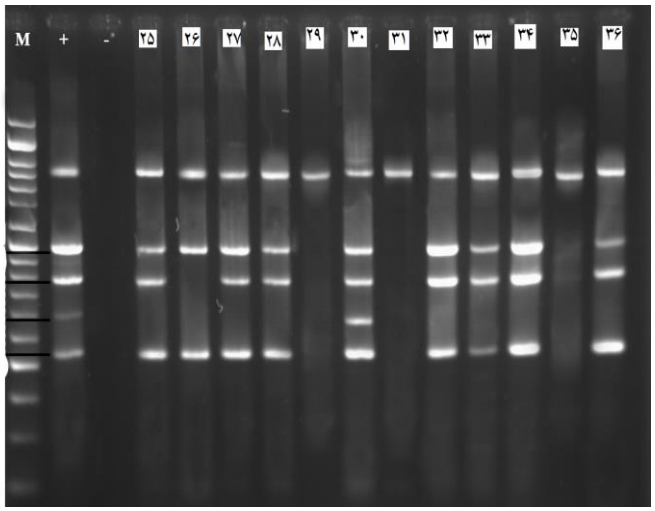
نمودار شماره ۱: توزیع فراوانی ژن‌های جداسازی شده بر حسب تعداد و درصد



تصویر شماره ۱: نتایج واکنش M-PCR برای شناسایی ژن های مورد مطالعه

به ترتیب از چپ به راست مارکر ۵۰ bp، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های جداسازی شده ۱۲-۱ حاوی ژن 16SrDNA با طول ۹۵۶ bp، نمونه‌های شماره ۲-۴- ۶-۸-۱۰-۱۲ به ترتیب واجد ژن‌های gyrB به طول ۲۲۲ bp، ژن ETA با محصول به طول ۳۹۷ bp و ژن oprL با طول ۵۰۴ bp، نمونه شماره ۳ دارای ژن gyrB به طول ۲۲۲ bp و نمونه‌های ۱-۵-۷-۹-۱۱ فقط ژن 16SrDNA قابل مشاهده می‌باشد.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017



تصویر شماره ۲: نتایج واکنش M-PCR برای شناسایی ژن های مورد مطالعه

به ترتیب از چپ به راست مارکر ۵۰ bp، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های جداسازی شده ۳۶-۲۵ حاوی ژن 16SrDNA با طول ۹۵۶ bp، نمونه‌های ۲۵-۲۷-۲۸-۳۰-۳۲-۳۳-۳۴-۳۶ به‌ترتیب دارای ژن‌های gyrB به طول ۲۲۲ bp، ژن ETA با محصول به طول ۳۹۷bp و ژن oprL با طول ۵۰۴ bp، نمونه شماره ۲۶ واجد ژن gyrB به طول ۲۲۲ bp و ژن oprL با طول ۵۰۴ bp، در نمونه‌های ۲۹-۳۱-۳۵ فقط ژن 16SrDNA قابل مشاهده می‌باشد.

بحث:

سودوموناس آئروژینوزا مهم‌ترین عامل بیماری‌زای فرصت طلب انسانی در جنس *سودوموناس* است. این باکتری از مهم‌ترین عوامل بیماری و مرگ و میر در مبتلایان به فیبروز سیستیک، نئوپلاسمی و سوختگی های شدید است. در دهه های اخیر در پی ابداع درمان آنتی بیوتیکی، *سودوموناس آئروژینوزا* به‌دلیل مقاومت ذاتی به اکثر آنتی بیوتیک ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن های بیمارستانی شناسایی شده است (۲). این باکتری به دلیل توانایی سازگاری با محیط، دارای تنوع ژنوتیپی زیادی است که منجر به واکنش‌های فنوتیپی غیرمعمول می‌شود. با اینکه شناسایی این باکتری به طور معمول وابسته به روش‌های فنوتیپی است، امروزه روش‌های مولکولی ازجمله PCR برای شناسایی جدایه‌های بیماری زا مؤثرتر و دقیق‌ترند (۳). در نقاط مختلف جهان مطالعات زیادی در جهت تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از روش‌های مولکولی و با به‌کارگیری ژن های مختلف انجام شده است و نتایجی به‌دست آمده است. *oprL* یکی از لیپوپروتئین های تشکیل دهنده پمپ ایفلاکس می باشد. حضور این ژن علاوه بر اینکه یک عامل حدت در *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد، نشانگر مناسبی در جهت تشخیص این گونه باکتریایی به‌شمار می رود. اولین بار Devos و همکاران، آزمون PCR ژن *oprL* را بر روی ۲۰ گونه متفاوت *سودوموناس* جدا شده از نمونه های بالینی انجام دادند. در این مطالعه فقط گونه های *سودوموناس آئروژینوزا* در PCR این ژن مثبت بودند و سایر گونه های *سودوموناس* منفی گزارش شدند. حساسیت و ویژگی این روش در مقایسه با روش کشت، به ترتیب ۱۰۰٪ و ۷۴٪ گزارش شد (۱۱). اصلانی و همکاران، شناسایی ژن‌های اختصاصی جنس و گونه *oprI* و *oprL* را بر روی نمونه های *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از عفونت های تنفسی را انجام دادند. ۱۰۰٪ نمونه ها با روش PCR نسبت به ژن‌های اختصاصی *oprI* و *oprL* مثبت بودند و تشخیص این گونه را با استفاده از این ۲ پرایمر معرفی نمودند (۶). در مطالعه حاضر نیز ۶۳/۳٪ نمونه‌ها دارای ژن *oprL* بودند که نتایج آن با

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017

نتایج مطالعه اصلانی تفاوت داشته و این بدین معنی است که صرفاً به‌کارگیری این پرایمر جهت شناسایی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* دارای حساسیت مناسب نمی‌باشد. Khan و همکاران اولین بار از ژن toxA جهت شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا* که قادر به تولید این توکسین بودند، استفاده کردند و نشان دادند این روش در مقایسه با روش‌های بیوشیمیایی دقیق‌تر می باشد (۱۲). پس از آن نیز مطالعات زیادی جهت تشخیص ژن‌های توکسین زا این باکتری صورت گرفت. Shi و همکاران به بررسی تشخیص هم زمان ۵ ژن انتروتوکسین زا در سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* در ۲۱۴ نمونه آب آشامیدنی و زیست محیطی باز روش M-PCR پرداختند. در این مطالعه ژن toxA در ۸۰٪ نمونه ها شناسایی شد. در این مطالعه، حضور ۵ ژن انتروتوکسین *سودوموناس آئروژینوزا* در یک روش واحد با سرعت بیشتر و با حساسیت بالاتر از روش های مرسوم تشخیص داده شد (۱۳). یوسفی و همکاران به بررسی ژن اگزوتوکسین A در سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* در زخم سوختگی از بیمارستان بعثت همدان پرداختند. در این مطالعه ۱۷۰ نمونه (بیوپسی پوست و خون) از بیماران سوختگی درجه ۲ و ۳ مورد بررسی قرار گرفت و ۷۹ نمونه کشت مثبت *سودوموناس آئروژینوزا* جدا گردید که ۹۳/۶۷٪ *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده دارای ژن *ETA* بودند. نتایج نشان داد، حساسیت روش PCR با واسطه ژن *ETA* در شناسایی سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* قابل توجه بوده و می توان از آن به‌عنوان یک فاکتور موثر با دقت بالا در تشخیص سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده کرد (۳). امینی و همکاران به بررسی حضور ژن *ETA* بر روی ۷۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران دچار سوختگی نوع ۲ و ۳ پرداختند. از ۷۰ سویه جدا شده از بیماران دچار سوختگی ۶۶ سویه در واکنش PCR دارای این ژن بودند. حساسیت این آزمایش ۹۴/۳٪ تعیین گردید (۲). اصلانی و همکاران، شناسایی این باکتری را با استفاده از ژن *ETA* را دارای اختصاصیت بالایی گزارش نمودند (۶). در مطالعه حاضر نیز میزان فراوانی ژن *ETA* ۶۱/۶٪ بود که نشان دهنده فراوانی بالای این ژن در جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از نمونه های بالینی می باشد. نجفی و همکاران به بررسی فراوانی ژن‌های *exoA*، *oprL* و *algD* با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای این ژن‌ها پرداختند. از ۷۰ نمونه بالینی مورد بررسی، نتایج مثبت PCR به‌ترتیب برای ژن های *exoA* و *oprL* در ۶۸ و ۷۰ نمونه به‌دست آمد که حساسیت به‌ترتیب ۹۷/۲٪ و ۱۰۰٪ به‌دست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد که با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی مناسب در تکنیک PCR معمولی می توان با حساسیت و ویژگی بسیار بالا کلونیزاسیون *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران حساس مانند سیستیک فیبروزیس خیلی زودتر از روش کشت نشان داد (۱۴). از آنجایی که ژن *gyrB* می تواند به عنوان یک ژن اختصاصی، *سودوموناس آئروژینوزا* را مورد شناسایی قرار دهد، مطالعات زیادی جهت شناسایی این ژن و با روش های مختلف صورت گرفته است. ازجمله در مطالعات Tang و همکاران و Qin و همکاران که از روش Real-time PCR بهره برده شد (۱۶،۱۵). Calisti و همکاران به شناسایی مولکولی گونه های *سودوموناس* با استفاده از یک روش مبتنی بر PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن های *16SrDNA* و *gyrB* در نمونه های محیطی و بالینی پرداختند. مشخص شد که این روش قادر به شناسایی *سودوموناس* در مخلوط میکروبی است که در آن این باکتری به وفور یافت نمی‌شود. در این مطالعه، Multiplex-PCR با ترکیبی از ۲ ژن هدف، بهترین انتخاب برای تمایز بین *سودوموناس آئروژینوزا* و گونه های بسیار مشابه معرفی شد (۱۷). نتایج مطالعه Calisti با تحقیق حاضر کاملاً همخوانی داشته و مؤید این مطلب است که استفاده از پرایمرهای اختصاصی ازجمله *16SrDNA* در تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* نقش مهمی داشته و موجب سرعت تشخیص نهایی در موارد خاص و فوری می‌باشد که زمان نقش حیاتی را در شناسایی و درمان عامل بیماری در افراد بستری ایفا

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017

می‌نماید. آقاملایی و همکاران از ۳ ژن *lasI*، *lasR* و *gyrB* جهت شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از عفونت زخم استفاده کردند. در این مطالعه که از روش Triplex-PCR استفاده شد، تمامی جدایه‌های شناسایی شده واجد این ۳ ژن بودند. در مطالعه حاضر نیز ۶۳/۳٪ جدایه ها دارای ژن *gyrB* بودند (۱۸). در مطالعه حاضر از چندین ژن و به طور همزمان با روش Multiplex PCR جهت شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا* بهره برده شد که این روش، روشی حساس و در عین حال دقیق در شناسایی این باکتری به شمار می رود. در مطالعه Salman و همکاران، جهت شناسایی سریع و دقیق *سودوموناس آئروژینوزا*، آزمون Multiplex PCR با استفاده از ۴ ژن که اختصاصی جنس، گونه و اگزوتوکسین *سودوموناس آئروژینوزا* بود (*16SrDNA*، *gyrB*، *oprL* و *ETA*)، انجام شد. در این مطالعه، شناسایی بر روی ۴۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* با مورفولوژی مشکوک به‌کار برده شد و ۱۸ نمونه به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* تأیید شد. ترکیب ۴ ژن گزارش شده دارای قابلیت اعتماد بیشتر و تشخیص جامع تری از *سودوموناس آئروژینوزا* است که برای غربالگری عفونت زخم و کمک به راه حل درمانی مناسب است (۸). علی‌رغم هزینه‌های بالای روش‌های ژنوتیپی در مقایسه با روش های فنوتیپی تشخیص باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، گسترش و بهره‌گیری از روش‌های نوین مولکولی، منجر به تشخیص دقیق و ارائه راهکار درمانی سریع و مؤثر و جلوگیری از بروز و گسترش ایزوله های مقاوم باکتری در میان جمعیت انسانی به خصوص بیماران بستری در بیمارستان ها می گردد.

نتیجه گیری:

با توجه به اهمیت شناسایی سریع باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و با توجه به مشکلات موجود در روش های بیوشیمیایی، روش‌های مولکولی مانند PCR روشی حساس و سریع در شناسایی این باکتری می باشد. به علاوه شناسایی همزمان چند فاکتور ویرولانس و با روش Multiplex PCR اختصاصیت بالایی به این کار می بخشد. ژن های *oprL*، *gyrB* و *ETA* دارای شیوع بالایی در جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* می باشند و نشانگر مناسبی جهت تشخیص این باکتری می باشند.

تشکر و قدردانی:

نگارنده ی این پایان نامه با کد ۳۶۷ کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد مهندس ابوالفضل مقدم که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌دارد.

منابع:

1. Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie. 2002; 84(5-6): 499-510.
2. Amini B, Kamali M, Mortazavi Y, Bayat E, Farhadi N, Javadi H. Cloning of Catalytic Domain of Exotoxin A from *Pseudomonas Aeruginosa*. Zanjan Univ Med Sci J. 2010; 18(71): 24-33.
3. Yousefi Mashouf R, Esmaeili R, Alikhani MY, Ghanbari M. Evaluation of exotoxin A gene and frequency of polymerase chain reaction sensitivity in detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Tehran Univ Med J. 2014; 72(3): 167-73.
4. Kidd TJ, Ramsay KA, Hu H, Bye PT, Elkins MR, Grimwood K, et al. Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2009; 47(5): 1503-9.
5. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2005; 4 Suppl 2: 37-43.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017

6. Aslani MM, Nikbin VS, Shahcheraghi F, Eidi A, Sharafi Z. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* from respirptory samples using *oprL*, *oprI* and exotoxin A. LorestanUni Med Sci J. 2009; 11(2): 23-9.
7. Forbes B, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 17th ed. Mosby. 2002; 1069-1090.
8. Salman M, Ali A, Haque A. A novel multiplex PCR for detection of *Pseudomonas aeruginosa*: A major cause of wound infections. Pak J Med Sci. 2013; 29(4): 957-61.
9. Salehi M, Hekmatdoost M, Hosseini F. Quinolone resistance associated with efflux pumps mexAB-oprM in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Microbial World. 2014; 6(4): 291-8.
10. 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.
11. De Vos D, Lim A, Jr., Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. J Clin Microbiol. 1997; 35(6): 1295-9.
12. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Appl Environ Microbiol. 1994; 60(10): 3739-45.
13. Shi H, Trinh Q, Xu W, Zhai B, Luo Y, Huang K. A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 95(6): 1579-87.
14. Najafimosleh M, Rashnotaie S, Ghaznavi Rad E, Abtahi H, Taleie G. Designing of the specific DNA primers for detection of the *exoA*, *oprL* and *algD* pathogenicity genes for rapid diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*. Tehran Univ Med J. 2013; 71(8): 493-501.
15. 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.
16. Tang Y, Zou J, Ma C, Ali Z, Li Z, Li X, et al. Highly sensitive and rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* based on magnetic enrichment and magnetic separation. Theranostics. 2013; 3(2): 85-92.
17. Calisti C, Ruzzi M. Development of innovative molecular methods for the detection and the identification of *Pseudomonas spp*. in environmental and clinical samples. Bulletin UASVM Anim Sci Biotech. 2009; 66(2): 1-5.
18. Aghamollaei H, Moghaddam MM, Kooshki H, Heiat M, Mirnejad R, Barzi NS. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by a triplex polymerase chain reaction assay based on *lasI/R* and *gyrB* genes. J Infect Public Health. 2015; 8(4): 314-22.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2016; 18(3): 48-56.

Original article

Concurrent isolation of virulence genes *ETA, oprL, gyrB* in *Pseudomonas aeruginosa* clinical samples from hospitals in Kerman by Multiplex-PCR

Kamali A[1], Amini K[2*]
[1]Microbiology Dept., Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, I.R. Iran; [2]Microbiology Dept., Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R. Iran.
Received: 23/Nov/2015 Accepted: 23/Dec/2015

Background and aims: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing nosocomial infections and mortality, especially in patients with a weakened immune system and leads to problems inherent resistance to antimicrobial agents in the treatment of infections. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes in Multiplex-PCR method.
Methods: A total of 60 samples of *Pseudomonas aeruginosa* including 40 samples from Passargad microbiology lab collection and 20 samples of hospitals in Kerman collected and cultured in specific media and were confirmed with biochemical tests. PCR reaction was done on all samples to identify virulence genes *ETA, oprL, gyrB* and the species *16SrDNA.*
Results: Of the 60 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, 38 samples (63.3%) contains gene *gyrB* and *oprL*, 37 samples (61.6%) had the gene *ETA*, and all had 60 isolate (100%) gene *16SrDNA.*
Conclusion: Considering the importance of rapid detection of this bacterium due to the incidence of resistance and presence of problems in biochemical methods, concurrent identification of multiple genes by Multiplex-PCR is a sensitive and accurative way in detecting the bacteria.

Keywords: **Multiplex PCR, Virulence genes, *Pseudomonas aeruoginosa*.**

Cite this article as: Kamali A, Amini K. Concurrent Isolation of Virulence genes *ETA, oprL, gyrB* in *Pseudomonas aeruginosa* clinical samples from hospitals in Kerman by Multiplex-PCR. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(3): 48-56.

[*]**Corresponding author:**
Microbiology Dept., Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R. Iran. Tel: 00989125454074, E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:27 +0430 on Tuesday July 18th 2017