مجلـــه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۳، شماره‌ی ۹۹، مهر و آبان ۱۳۹۴، صفحات ۵۲ تا ۶۳

فراوانی ژن‌های کد کننده سیتوتوکسین‌های *exoT* ، *exoY*، *exoS* و *exoU* سیستم ترشحی تیپ ۳ در *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی

دکتر سید سجاد خرم روز[۱]، نسیم راهبری[۲]، نجمه پرهیزگاری[۳]، دکتر اصغر شریفی[۴]، محبوبه یزدان پناه[۵]، دکتر فرزانه غریب پور[۶]، دکتر سید محمد رضا ربانی[۷]، سید علی اصغر ملک حسینی[۸]، مسعود مرعشی فرد[۹]

نویسنده‌ی مسوول: یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی khoramrooz@gmail.com

دریافت: ۹۳/۶/۱۹ پذیرش: ۹۴/۱/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس ائروجینوزا از عوامل مهم عفونت‌های سوختگی در بیمارستان‌ها است. این باکتری با تولید فاکتورهـای بیمـاری‌زایـی متعدد سبب ایجاد بیماری می‌شوند که بعضی از آن‌ها از طریق سیستم ترشحی تیپ ۳ به درون سلول‌هـای یوکـاریوتی وارد مـی‌شـوند. هـدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی ژن‌های کد کننده سیتوتوکسین‌هـای exoT, exoY, exoS و exoU در بـین نمونـه‌هـای کلینیکـی سـودوموناس ایروجینوزا جدا شده از بیماران سوختگی بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی- تحلیلی و طی یک دوره یکساله، ۹۵ ایزوله سودوموناس ایروجینوزا از عفونت سوختگی بیماران بستری در بیمارستان پس از تعیین هویت با تست‌های بیوشیمیایی جمع‌آوری شد. شناسایی اگزوتوکسین‌های افکتـوری exoT, exoY, exoS و exoU بـا روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد. الگوی حساسیت ایزوله‌ها نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک بررسی شد. داده‌ها با نـرم افـزار SPSS نسخه ۱۶ و روش آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $P<0/05$ در نظر گرفته شد.*

یافته‌ها: *تمام ایزوله‌های سودوموناس ایروجینوزا حاوی ژن exoT بودند در حالی‌که ۶۹/۵ درصد ایزوله‌های ژن exoY را داشتند. میزان فراوانـی ژن‌های exoU و exoS از سایر ژن‌ها پایین‌تر و به‌ترتیب ۴۴/۱ و ۳۵/۸ درصد بودند. ۸/۴ درصد از ایزوله‌ها به طور هم‌زمان دارای هر چهـار ژن ذکر شده بودند. همراهی دو ژن exoS و exoU در حدود ۱۰/۵ درصد از ایزوله‌ها دیده شد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیـوتیکی نـسبت بـه سـفپیم، افلوکساسین و آزترونام دیده شد.*

نتیجه گیری: *با توجه به فراوانی پایین ژن exoS در سودوموناس ایروجینوزا مولد عفونت‌های سوختگی و مقایسه آن با سایر عفونت‌های ناشی از این باکتری، اهمیت کمتر این ژن را در فرایند عفونت سوختگی در مقایسه با سایر ژن‌ها نشان می‌دهد. ولی برخلاف ایـن ژن، exoT و exoY در غالب ایزوله‌ها یافت شدند که احتمالا باکتری‌های حاوی آن‌ها نقش بیشتری در عفونت‌های سوختگی دارند.*

واژگان کلیدی: ***سودوموناس ائروجینوزا، عفونت سوختگی، سیتوتوکسین‌های ترشحی***

۱- دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، استادیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج
۳- دانشجوی دکترای تخصصی ویروس شناسی پزشکی، گروه ویروس شناسی ،دانشکده ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه شیراز
۷- متخصص کلیه و مجاری ادراری، دانشیار بیمارستان آموزشی شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
۸ و۹- دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج

مقدمه

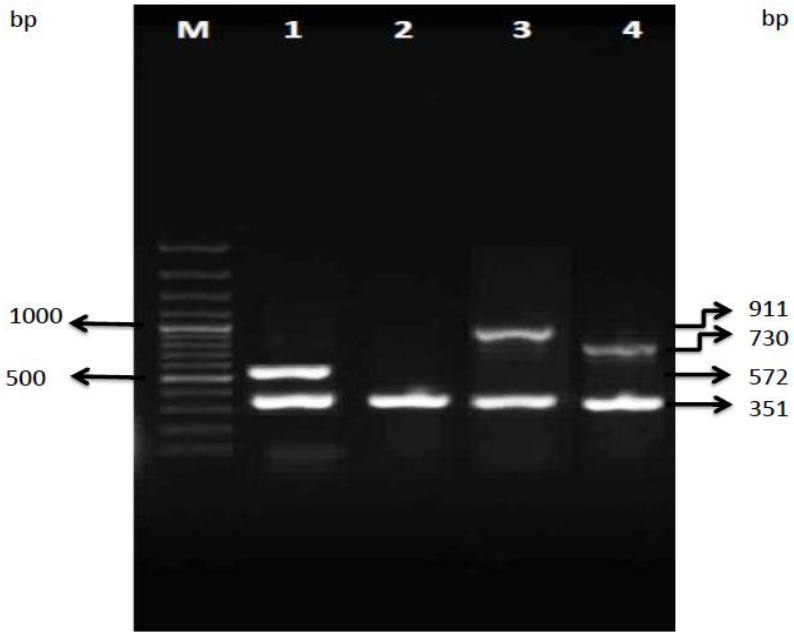
سودوموناس آئروجینوزا یک باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت طلب است که طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل بیماری‌های ریوی، عفونت خون، عفونت دستگاه ادراری، عفونت‌های جراحی و عفونت بافت نرم را ایجاد می‌کند (۱). این باکتری به‌عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های شدید در بیماران دچار سوختگی در سراسر دنیا است (۲). *سودوموناس آئروجینوزا* تمایل زیادی به محیط مرطوب و گرم سوختگی دارد و عفونت‌های زخم سوختگی ایجاد شده توسط این باکتری مشکل ساز هستند (۳). این عفونت‌ها به‌صورت موضعی شروع می‌شوند و سپس می‌توانند به بافت‌های عمقی گسترش پیدا کنند که زمینه را برای ایجاد سپسیس و در نهایت مرگ و میر در بیماران ایجاد می‌کند (۴). *سودوموناس آئروجینوزا* با واسطه مکانیسم‌های متعدد مثل کاهش نفوذپذیری غشای خارجی، بیان پمپ‌های افلاکس و تولید آنزیم‌های غیر فعال کننده آنتی‌بیوتیک‌ها مثل سفالوسپورینات به تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند. به‌علاوه این میکروارگانیسم توانایی زیادی در کسب و انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد که مرتبط با اندازه بزرگ و تنوع ژنوم و حضور آن در محیط‌های گوناگون است که می‌تواند به عنوان مخزن برای سایر باکتری‌ها نیز عمل کند (۵). فراوانی بالای *سودوموناس آئروجینوزای* مقاوم به چند دارو MDR (Multi Drug Resistance) مشکلات درمانی زیادی را ایجاد کرده است. MDR به ایزوله‌ای که حداقل به یک دارو در سه گروه آنتی‌بیوتیکی متفاوت مقاوم باشد گفته می‌شود. اگرچه افزایش روزافزون مقاومت به داروهای ضدمیکروبی، درمان دارویی این باکتری را با مشکل مواجه ساخته است، همچنین به نظر می‌رسد بیماری‌زایی *سودوموناس آئروجینوزا* در ارتباط با تولید تعداد زیادی از فاکتورهای بیماری‌زایی ترشحی و مرتبط با ساختار دیواره سلولی است (۶). اغلب توکسین‌های ترشحی در باکتری‌ها از طریق سیستم ترشحی تیپ ۱ تا ۵ منتقل می‌شوند (۷). در میان سیستم‌های ترشحی ذکر شده، سیستم ترشحی تیپ ۳ به‌عنوان یک عامل ویرولانس بالقوه در تعداد زیادی از باکتری‌های بیماری‌زا و از جمله *سودوموناس آئروجینوزا* وجود دارد (۸). از لحاظ ساختاری سیستم ترشحی تیپ ۳ شبیه سرنگ است که در تماس بین باکتری و سلول‌های یوکاریوتی میزبان، توکسین‌های باکتریایی را به درون این سلول‌ها وارد می‌کند. این سیستم ترشحی در تماس با سلول‌های یوکاریوتی فعال می‌شود (۹). مهم ترین ژن‌هایی که محصول آن‌ها به‌عنوان سیتوتوکسین‌های افکتوری مطرح هستند شامل ***exoT***, ***exoY*** ,***exoS*** و ***exoU*** می‌باشند که سبب کد شدن پروتئین‌های افکتوری مربوطه هستند و از طریق سیستم ترشحی تیپ ۳ ترشح می‌شوند (۱۲-۱۰). این پروتئین‌ها می‌توانند بر روی مسیرهای انتقال سیگنال اثر بگذارند و ایمنی ذاتی را خنثی کنند (۷). ***ExoS*** آنزیمی است که ۴۵۳ اسید آمینه دارد، دومین (Domain) ترشحی این آنزیم در ۱۵ اسید آمینه ابتدایی ناحیه آمینی قرار دارد. دومین متصل شونده به چاپرون از اسید آمینه شماره ۱۵ تا ۵۱ تشکیل شده است و اسید آمینه شماره ۵۱ تا ۷۲ در اتصال توکسین به غشا نقش دارد. سیگنال ترشحی، این توکسین افکتوری را به درون ساختار سیستم ترشحی تیپ ۳ هدایت می‌کند. فعالیت GTPase این دومین به اسید آمینه آرژینین در موقعیت ۱۴۶ وابسته است (۱۴و ۱۳). ***ExoT*** آنزیم دیگری با ۴۵۷ اسید آمینه است که ساختاری مشابه ***ExoS*** دارد که در ۵۰ اسید آمینه ابتدایی ناحیه آمینی آن، دومین ترشحی، دومین متصل شونده به چاپرون و دومین متصل شونده به غشا حضور دارند. فعالیت GTPase این اگزوتوکسین همانند ***ExoS*** به اسید آمینه آرژینین وابسته است و اسید آمینه گلوتامات در موقعیت ۳۸۳ و ۳۸۵ برای فعالیت ADP-ریبوزیلاسیون ضروری است (۱۵). ***ExoS*** و ***ExoT*** آنزیم‌های دو عملکردی هستند که از یک طرف باعث افزایش

فعالیت GTPase فعال کننده‌ی پروتئین‌ها می‌شوند و از طرف دیگر دارای فعالیت انتقال ADP- ریبوزیل (ADPR) هستند که ADP- ریبوزیل را به پروتئین‌های مختلف مثل Ras و GTPase های شبیه Ras منتقل می‌کند. این دو فعالیت آنزیمی متمایز می‌توانند به‌طور فزاینده‌ای باعث تخریب اکتین اسکلت سلولی شوند که در نهایت اثرات مخربی را بر عملکردهای سلول میزبان اعمال می‌کنند (۱۶). *ExoY* یک آدنیلات سیکلاز ترشحی است که ۳۷۸ اسید آمینه دارد و دارای ۲ دومین است که با هم در اتصال به ATP نقش دارند. فعالیت این توکسین وابسته به لیزین ۸ و ۸۸ و آسپارتات ۲۱۲ و ۲۱۴ است که همه‌ی آن‌ها در دومین متصل شونده به ATP حضور دارند (۱۷). *ExoY* یک آدنیلات سیکلاز است که برای فعالیت خود نیاز به یک کوفاکتور ناشناخته سلول میزبان دارد، نقش آن در بیماری‌زایی ناشناخته است اگرچه در کشت سلولی باعث گرد شدن سلول‌ها می‌شود (۱۸). *ExoU* به‌عنوان عضوی از آنزیم‌های خانواده فسفولیپاز است و حداقل دارای فعالیت فسفولیپاز A2 است. این توکسین دارای ۶۸۷ اسید آمینه در ساختار خود است، که فعالیت فسفولیپازی آن وابسته به سرین ۱۴۲ و آسپاراژین ۳۴۴ است. دومین ترشحی این اگزوتوکسین در ناحیه ۱۵ اسید آمینه ابتدایی آمینی آن قرار دارد و دومین متصل شونده به چاپرون بین ناحیه ۳ و ۱۲۳ واقع شده است (۲۰و ۱۹). در سلول‌های پستانداران تزریق مستقیم ExoU باعث آسیب غیر قابل برگشت به غشاء سلولی و مرگ نکروتیک سریع می‌شود (۲۱). با توجه به اینکه *سودوموناس آئروجینوزا* از عوامل مهم عفونت‌های زخم سوختگی است و این باکتری با دارا بودن سیستم ترشحی تیپ ۳ قادر است اگزوتوکسین‌های افکتوری خود شامل *ExoT*, *ExoY*, *ExoU* و *ExoS* را به درون سلول میزبان وارد نماید و این اگزوتوکسین‌ها نه تنها باعث تخریب سد اپی‌تلیال آسیب دیده می‌شوند، بلکه به اندوتلیال هم آسیب می‌زنند (۲۲) و به‌علاوه تخریب اپیتلیوم به میکروارگانیسم اجازه می‌دهد به درون جریان خون وارد شود و با به راه انداختن واسطه‌های پیش التهابی در درون جریان خون زمینه را برای شوک عفونی فراهم می‌کند (۲۳). از طرف دیگر *ExoT* با جلوگیری از ترمیم زخم سبب تسهیل تهاجم شده و احتمال انتشار پاتوژن‌ها را در مکان عفونت فراهم می‌آورد (۹). نظر به اینکه مطالعات محدودی در ارتباط با فراوانی ژن‌های افکتوری سیتوتوکسین در ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* وجود دارد و در این زمینه تنها یک مطالعه در ایران گزارش شده است، با توجه به اهمیت ژن‌های ذکر شده در بیماری‌های مختلف کلینیکی، هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی ژن‌های کد کننده سیتوتوکسین‌های *exoT*, *exoY*, *exoS* و *exoU* در بین نمونه‌های کلینیکی *سودوموناس ایروجینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی بود.

روش بررسی

در این مطالعه که ازنوع مقطعی- توصیفی بود، ۹۵ نمونه‌ی کلینیکی *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از زخم سوختگی بیماران بستری در بخش سوختگی بیمارستان طالقانی اهواز طی سال ۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفت. هریک از ایزوله‌های باکتریایی از بیمار متفاوتی جداسازی شد. با استفاده از مورفولوژی کلنی، تولید رنگدانه، رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مثل تست اکسیداز، کاتالاز، اکسیداسیون- تخمیر (OF) و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد این باکتری‌ها تعیین هویت شدند و در دمای ۲۰- درجه ی سانتی‌گراد در محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول نگهداری شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفپیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفاکلر، سیپروفلوکساسین، اوفلوکساسین، آزترونام، مروپنم و پیپراسیلین- تازوباکتام (MAST, UK) با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن و بر اساس دستورالعمل CLSI بررسی

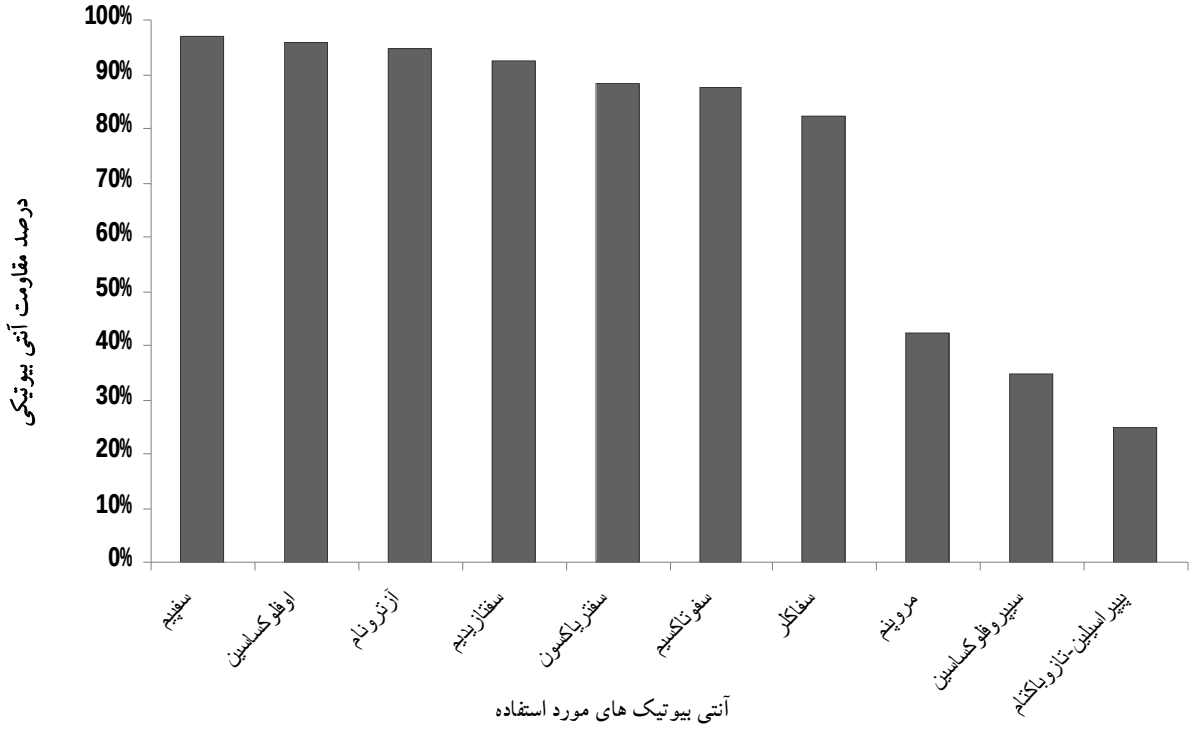
شد (۲۴). به منظور شناسایی ژن‌های *exoS ,exoY ,exoT* و *exoU* کد کننده‌ی سیتوتوکسین‌های ترشحی از پرایمرهای طراحی شده قبلی (۲۵) و روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده گردید. به منظور تهیه DNA الگو برای واکنش PCR از کشت تازه ۲۴ ساعته باکتری‌ها استفاده شد و با استفاده از روش جوشاندن (boiling) استخراج DNA باکتری‌ها صورت گرفت (۲۶). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها معادل ۲۰ پیکومول در هر واکنش (سیناژن، ایران) و ۵ میکرولیتر از DNA مکمل انجام گرفت. شرایط دمایی و زمانی انجام واکنش شامل جداشدن اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۲ سیکل شامل جدا شدن دو رشته DNA به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای *exoS* و *exoY* و دمای ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای *exoU* و *exoT* هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. برای بررسی حضور باندهای حاصل از تکثیر و طویل سازی ژن‌های مورد نظر ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از Loading Dye مخلوط و در داخل چاهک ژل آگارز ۱ درصد وارد شد و جهت انجام الکتروفورز از ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید، درون دستگاه Gel Documentation وارد و مورد بررسی قرار گرفت. اندازه باند ۵۷۲ جفت بازی برای ژن*exoS*، اندازه ۷۳۰ جفت بازی برای ژن *exoY*، اندازه ۳۵۱ جفت بازی برای *exoT* و اندازه ۹۱۱ جفت بازی برای *exoU* نشان دهنده حضور هریک از ژن‌های مورد بررسی بود. شکل ۱ *سودوموناس آئروجینوزا* PAO1 که حاوی ژن‌های *exoS, exoT* و *exoY* بود به عنوان کنترل استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز ژن‌های exoU ,exoY ,exoT و exoS در سودوموناس ایروجینوزا جدا شده از عفونت سوختگی.
ستون M: DNA مارکر، ستون ۱ exoT و exoS ، ستون ۲ exoT ، ستون ۳ exoT و exoU ، ستون ۴ exoT و exoY

یافته‌ها

باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* مورد مطالعه از ۵۹ مرد (۶۲/۱ درصد) و ۳۶ زن (۳۷/۹) جداسازی شد که این بیماران در گروه سنی ۲ تا ۴۸ سال بودند. در میان این افراد ۳۰/۵ درصد سوختگی درجه ۳ و ۶۹/۵ درصد سوختگی درجه ۲ داشتند. نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین میزان مقاومت به سفپیم، افلوکساسین و آزترونام به ترتیب با ۹۶/۸، ۹۵/۸ و ۹۴/۷ درصد و کمترین میزان مقاومت به پیپراسیلین-تازوباکتام، سیپروفلوکساسین و مروپنم به ترتیب با ۲۸/۴، ۳۴/۷ و ۴۲/۱ درصد وجود دارد. نمودار ۱، ۱۰ ایزوله به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاوم بودند. ۸۹/۴ درصد از ایزوله‌ها MDR گزارش شدند.



نمودار ۱: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های سودوموناس ایروجینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

نتایج حاصل از فراوانی ژن‌های کد کننده اگزوتوکسین‌های افکتور نشان داد که تمام ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* (۱۰۰ درصد) حاوی ژن *exoT* بودند در حالی‌که ۶۹/۵ درصد ایزوله‌های داری ژن *exoY* بودند. میزان فراوانی ژن‌های *exoU* و *exoS* از سایر ژن‌ها پایین‌تر و به‌ترتیب ۴۴/۱ و ۳۵/۸ درصد بودند. تمام ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* حداقل یکی از ژن‌های توکسین‌های افکتوری سیستم ترشحی تیپ ۳ را حمل می‌کردند. ۸/۴ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* به‌طور هم‌زمان دارای هر چهار ژن ذکر شده بودند. حضور همزمان سه ژن *exoY, exoT* و *exoU* در ۲۵/۲ درصد از ایزوله‌ها یافت شد ولی ۱۸/۹ درصد از باکتری‌ها دارای سه ژن *exoY, exoT* و *exoS* بودند. ژن *exoT* به تنهایی در ۱۷/۹ درصد درصد از *سودوموناس آئروجینوزا* شناسایی شد و

همراهی ژن *exoT* و *exoY* باهم و یا همراه با سایر ژن‌ها ۶۸/۴ درصد بود. همراهی دو ژن *exoS* و *exoU* در حدود ۱۰/۵ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* دیده شد.

در جدول ۱ توزیع اگزوتوکسین‌های مختلف در بین ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* آورده شده است.

جدول ۱: پراکنش ژن‌های اگزوتوکسین افکتوری سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های سوختگی

تعداد اگزوتوکسین در الگو	الگوی ژن‌های سیتوتوکسین افکتوری در باکتری	تعداد ایزوله‌های حاوی الگوی اگزوتوکسین	تعداد ایزوله‌های دارای گزوتوکسین (%)	تعداد ایزوله‌های مقاوم به چند آنتی بیوتیک (MDR)
٤	*exoT,exoY, exoU, exoS*	٨	٨ (%٨/٤)	٧
٣	*exoT,exoU, exoS*	٢	٤٥(%٤٧/٤)	٤١
	exoT,exoY,exoU	٢٤		
	exoT,exoY,exoS	١٩		
٢	*exoT,exoU*	٥	٢٥(%٢٦/٣)	٢٢
	exoT,exoS	٥		
	exoT,exoY	١٥		
١	*exoT*	١٧	١٧(%١٧/٩)	١٥

بررسی ارتباط بین حضور ژن‌های اگزوتوکسین و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که از لحاظ آماری بین حضور ژن *ExoY* و مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (P=۰/۰۳۲)، *ExoS* و مقاومت به سیپروفلوکساسین (P=۰/۰۲۵)، *ExoU* و مقاومت به مروپنم (P=۰/۰۱۶) اختلاف معنی‌داری وجود داشت در حالی‌که درمورد حضور این ژن‌ها و مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

بحث

با توجه به اهمیت اگزوتوکسین‌های افکتوری *سودوموناس آئروجینوزا* در بیماری‌زایی و آسیب به سلول‌های یوکاریوتی و هم‌چنین مقاومت روزافزون این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی اگزوتوکسین‌های *exoT exoY, exoS* و *exoU* و همچنین بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری در بیماران سوختگی بود. در این مطالعه نشان داده شد که تمام ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* حداقل یکی از اگزوتوکسین‌های افکتوری را دارند. ژن *exoT* در تمام ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* شناسایی شد. نتایج این مطالعه مشابه گزارشات ارایه شده توسط فلتمن و همکاران بود که نشان داد تمام ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* که از منابع مختلف کلینیکی جدا شده‌اند همگی دارای ژن *exoT* بودند (۲۱). به‌علاوه مطالعه‌ی دیگری در کشور آمریکا بر روی باکتری‌های جدا شده از زخم، ادرار و خون نتایج مشابهی را نشان داد (۲۷). در مطالعه‌ی مشابه دیگری که بر روی *سودوموناس آئروجینوزای* جدا شده از زخم سوختگی توسط جبل عاملی و همکاران در تهران نشان داده شده بود مشخص شد که تمام ایزوله‌ها واجد ژن *exoT* هستند (۲۵).

همچنین در این مطالعه مشابه با سایر مطالعات مشخص شد که فراوانی ژن‌های سیتوتوکسین *exoT* و *exoY* در مقایسه با سایر ژن‌ها بیشتر است. در مطالعه‌ی حاضر فراوانی ژن *exoY* به میزان ۶۸/۵ درصد بود که در مقایسه کمتر از گزارشات ارایه شده توسط وون برینگر و همکاران (۸۴ درصد)، فلتمن و همکاران (۸۹ درصد) و جبل عاملی و همکاران (۹۵ درصد) بوده است (۲۷و ۲۵، ۲۱). ژن دیگری که مورد مطالعه واقع شد، ژن سیتوتوکسین *exoU* بود که ۴۱/۱ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* حاوی این ژن بودند که از لحاظ فراوانی در بعضی مطالعات بین ۲۷ درصد تا ۲۸/۳ درصد شناسایی شده است (۲۹- ۲۷و۲۱) ولی در گزارشی از تهران در تعداد قابل توجهی از ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* (۶۴/۵ درصد) این ژن شناسایی شد (۲۵). کمترین میزان فراوانی برای ژن‌های مورد بررسی مربوط به ژن *exoS* بود که در ۳۵/۸ درصد از باکتری‌ها یافت شد. جبل عاملی و همکاران میزان فراوانی *exoS* را در *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی ۲۹ درصد گزارش کردند (۲۵)، در حالی که در ایزوله‌های جدا شده از سایر منابع کلینیکی میزان فراوانی این اگزوتوکسین بسیار بالاتر از مطالعه حاضر است. به طور مثال در خلط بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک در مطالعه ی فلتمن و همکاران این اگزوتوکسین ۸۵ درصد، جین و همکاران ۹۲ درصد و آذرگون و همکاران ۷۵ درصد گزارش شد (۳۰و ۲۹و ۲۱). همان‌طور که از نتایج این مطالعه و تحقیقات مشابه صورت گرفته بر می‌آید، مشاهده می‌شود که ژن *exoT* در تمام سویه‌های *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از منابع مختلف بالینی و همچنین منابع محیطی حضور دارد. به‌علاوه ژن *exoY* نیز با فراوانی بالا از همین مطالعات گزارش شده است ولی از طرف دیگر ژن‌های *exoS* و *exoU* از فراوانی کمتری در مقایسه با دو ژن *exoT* و *exoY* برخوردار هستند و از طرف دیگر در مطالعات مختلف با فراوانی متفاوتی گزارش می‌شوند که منعکس کننده ی این واقعیت است که ژن‌های کد کننده سایتوتوکسین‌های *ExoS* و *ExoU* به‌عنوان یک خصوصیت متغیر در ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* وجود دارند و حضور آن‌ها به محل ایجاد بیماری توسط باکتری و عوامل زمینه‌ای بستگی دارد (۳۱)، به‌طوری‌که در مطالعات مختلف بین حضور ژن *exoS* در باکتری و نوع بیماری کلینیکی ایجاد شده توسط این ارگانیسم و یا بین حضور ژن *exoU* و مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک خاص ارتباط معنی‌داری نشان داده شده است (۲۷). در مطالعه ی حاضر همراهی ژن *exoT* و *exoY* در ۶۹/۴ درصد از ایزوله‌ها نشان داده شده است، در حالی‌که همراهی ژن *exoS* و *exoU* حدود ۱۰/۵ درصد است. بر اساس مطالعات به نظر می‌رسد ایزوله‌هایی که حاوی ژن *exoS* هستند به طور غالب ژن *exoU* را حمل نمی‌کنند و بر عکس در همراهی با این نتایج فلتمن و همکاران در ۱۱۵ ایزوله مورد بررسی مشاهده کردند که ۸۲ ایزوله دارای ژن *exoS*، فاقد ژن *exoU* هستند و همچنین ۳۱ ایزوله حاوی ژن *exoU* فاقد ژن *exoS* بودند و تنها در یک ایزوله به‌طور هم زمان هر دو ژن یافت شد (۲۱)، در مقایسه سایر گزارشات ارایه شده حضور هم زمان هر دو ژن را ۴/۱۶، ۸/۵ و ۹ درصد نشان دادند (۲۹- ۲۵،۲۷) که بعضی از این نتایج تقریبا مشابه با مطالعه‌ی حاضر است. هنوز علت این ارتباط غیر معمول مشخص نیست هر چند بعضی از مطالعات پیشنهاد کردند که وجود ارتباط معکوس بین حضور ژن *exoU* و *exoS* این است که این دو ژن یک لوکوس مشابه را در درون کروموزوم به کار می‌برند به طوری‌که حضور یکی از این ژن‌ها در درون کروموزوم مانع از کسب ژن دیگری به درون کروموزوم می‌شود هرچند مطالعات دیگری نشان داده‌اند محل ورود این دو ژن در درون کروموزوم متفاوت و از هم فاصله دارند (۲۱). الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که در این مطالعه ۸۹/۴ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا*، MDR بودند که در مقایسه از گزارشات ارایه شده توسط رنجبر و

همکاران در تهران (۱۰۰ درصد) و مرادیان و همکاران در بابل (۹۸/۱ درصد) کمتر بود (۳۲ و ۳) ولی مشابه مطالعه دیگری توسط میرصالحیان و همکاران از تهران (۸۷/۱ درصد) بود (۳۳). کمترین میزان حساسیت نسبت به پیپراسیلین-تازوباکتام به میزان ۲۸/۴ درصد دیده شد که کمتر از نتایج مطالعه‌ای دیگر به میزان ۶۲/۷ درصد بود (۳۳). همچنین در این مطالعه میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین و مروپنم در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده پایین و به میزان ۳۴ درصد و ۴۲/۱ درصد بود. در مطالعه‌های میرصالحیان و همکاران و مرادیان و همکاران مقاومت به سیپروفلوکساسین به‌ترتیب ۸۹/۵ و ۳۸/۹ درصد و نسبت به ایمی‌پنم ۶۱/۲ و ۵۳/۷ درصد بود (۳۳ و ۳۲) که مشاهده می‌شود در مطالعه‌ی حاضر میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده پایین‌تر است. به نظر می‌رسد تفاوت در مدت زمان بستری بیماران سوختگی در بیمارستان، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در همان آغاز بستری شدن در بیمارستان، تفاوت در شرایط بهداشتی و استفاده نابجا و غیر صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها و ماهیت ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها از عوامل احتمالی تفاوت در میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعات مختلف است. مشابه با سایر مطالعات، مقاومت بالایی نسبت به سفپیم، سفتریاکسون و آزترونام در این مطالعه دیده شد (۳۳و۳۲، ۲۵). در این مطالعه بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و حضور اگزوتوکسین *exoY*، مقاومت به سیپروفلوکساسین و اگزوتوکسین *exoS* و مقاومت به مروپنم و اگزوتوکسین *exoU* از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری دیده شد. در حالی که این ارتباط در سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و اگزوتوکسین‌ها معنی‌دار نبود. بر خلاف نتایج مطالعه‌ی حاضر در مطالعه‌ی برینگر و همکاران بین مقاومت به فلوروکینولون‌ها و حضور ژن *exoU* ارتباط معنی‌داری یافت شد. در این ارتباط مطالعه دیگری جهت بررسی و مقایسه یافت نشد. پیشنهاد می‌شود مطالعاتی بر روی ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از منابع مختلف کلینیکی و محیطی صورت گیرد و علاوه بر بررسی و مقایسه فراوانی اگزوتوکسین‌ها در گروه‌های مختلف، ارتباط بین مقاومت نسبت به یک آنتی‌بیوتیک یا دسته‌های آنتی‌بیوتیکی و حضور اگزوتوکسین خاص را در این منابع کلینیکی خاص بررسی شود.

نتیجه گیری

تمام ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* حداقل یکی از ژن‌های سیتوتوکسین افکتوری سیستم ترشحی تیپ ۳ را دارند، که در بین آن‌ها ژن *exoT* در تمام ایزوله و ژن *exoS* کمترین فراوانی را در ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی داشت. مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی در ایزوله‌های باکتریایی مشاهده شد به‌طوری‌که ۸۹/۴ درصد از ایزوله‌ها مقاوم به چند دارو بودند که در این زمینه بایستی در زمینه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها دقت کافی به عمل آید. تنها بین حضور اگزوتوکسین‌های *exoS*، *exoY* و *exoU* و به‌ترتیب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم و ایمی‌پنم ارتباط معنی‌داری یافت شد که با توجه به مطالعات محدود در این زمینه، نیازمند تحقیقات بیشتری در آینده، جهت بررسی این ارتباطات است.

References

1- Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med*. 2009; 37: 1777-86.

2- Jabalameli F, Mirsalehian A, Sotoudeh N, et al. Multiple-locus variable number of tandem repeats (VNTR) fingerprinting MLVF and antibacterial

resistance profiles of extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* among burnt patients in Tehran. *Burns*. 2011; 37: 1202-7.

3- Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. *Acta Med Iran*. 2011; 49: 675-9.

4- Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP, Herndon DN. Emerging infections in burns. *Surg Infect (Larchmt)*. 2009; 10: 389-97.

5- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, et al. *Pseudomonas aeruginosa:* resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13: 560-78.

6- Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis*. 2001; 183: 1767-74.

7- Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*. 2009; 12: 61-6.

8- Gala´n JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. 1999; 284: 1322-28.

9- Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci*. 2012; 13: 831-42.

10- Lin HH, Huang SP, Teng HC, Ji DD, Chen YS, Chen YL. Presence of the exoU gene of *Pseudomonas aeruginosa* is correlated with cytotoxicity in MDCK cells but not with colonization in BALB/c mice. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 4596-7.

11- Lee VT, Smith RS, Tu¨ mmler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun*. 2005; 73: 1695-705.

12- Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa:* infection by injection. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7: 654-65.

13- Shen DK, Quenee L, Bonnet M, et al. Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Environ Sci*. 2008; 21: 103-9.

14- Radke J, Pederson KJ, Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a biglutamic acid ADP-ribosyltransferase. *Infect Immun*. 1999; 67: 1508-10.

15- Garrity-Ryan L, Kazmierczak B, Kowal R, Comolli J, Hauser A, Engel JN. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect Immun*. 2000; 68: 7100-13.

16- Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2004; 152: 79-92.

17- Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri

JT, Frank DW. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 13899-904.

18- Cowell BA, Evans DJ, Fleiszig SMJ. Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 250: 71-76.

19- Sitkiewicz I, Stockbauer KE, Musser JM. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol.* 2007; 15: 63-69.

20- Rabin SD, Hauser AR. Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun.* 2005; 73: 573-82.

21- Feltman H, Schulert G, Khan S, et al. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa. Microbiology.* 2001; 147: 2659-69.

22- Kudoh I, Wiener-Kronish JP, Hashimoto S, Pittet J F, Frank D. Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury. *Am J Physiol*. 1994; 267: 551-6.

23- Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest.* 1999; 104: 743-750.

24- Clinical Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. vol. 31, 2011, pp .M100-M121.

25- Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. *Burns.* 2012; 38: 1192-7.

26- Fatholahzadeh B, Hashemi FB, Emaneini M, Aligholi M, Nakhjavani FA, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran. *DARU J Pharm Sci.* 2006; 14: 141-5.

27- Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, Flanagan J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 330-6.

28- Strateva T, Markova B, Ivanova D, Mitov I. Distribution of the type III effector proteins-encoding genes among nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria. *Annals Microbiol.* 2010; 60: 503-50.

29- Jain M, Ramirez D, Seshadri R, et al. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5229-37.

30- 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. *Pejouhesh.* 2013; 37: 189-193.

31- Choy MH, Stapleton F, Willcox MD, Zhu H. Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. *J Med Microbiol*. 2008; 57: 1539-46.

32- Moradian Kouchaksaraei F, Ferdosi Shahandashti E, Molana Z, et al. Molecular detection of integron genes and pattern of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from intensive care unit, Shahid Beheshti hospital, north of Iran. *Int J Mol Cell Med*. 2012; 1: 209-17.

33- Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*. 2010; 36: 70-4.

Frequency of type III Secretion System Cytotoxins -Encoding Genes among *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Burn Patients

Khoramrooz SS[1], Rahbari N[2], Parhizgari N[3], Sharifi A[1], Yazdanpanah M[4], Gharibpour F[5], Rabani SM[6], Malekhosseini SAA[7], Marashifard M[7]

[1]Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

[2]Yasouj Islamic Azad University, Yasouj, Iran.

[3]Dept. of Virology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[4]Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[5]Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

[6]Beheshti Teaching Hospital, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

[7]Student Research Committee,Yasuj University of Medical Sciences,Yasuj, Iran

Corresponding Author: Khoramrooz SS, Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

E-mail: khoramrooz@gmail.com

Received: 10 Sep 2014 **Accepted:** 12 Apr 2015

Background and Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing nosocomial burn infections. Disease results from the production of numerous virulence factors, some of which are injected directly into the eukaryotic host cells via the type III secretion system (T3SS).The aim of this study was to determine the prevalence of cytotoxins encoding *exoT, exoY, exoS* and *exoU* genes among the *P. aeruginosa* isolated from burn patients.

Materials and Methods: Over one year period of study, a total of 95 isolates of *P. aeruginosa* were collected and identified from burn infections in hospitalized patients. Polymerase chain reaction (PCR)-based method was used for detection of *exoT, exoY exoS* and *exoU* genes. According to CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) guidelines antimicrobial susceptibility testing was performed by disc diffusion method against 10 antibiotics. The data were analyzed by χ^2 test. A p value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results: All of the isolates of *P. aeruginosa* contained exoT gene while exoY gene was detected in 69.5 % of isolates. The prevalence of *exoU* and *exoS* genes was 44.1% and 35.8%, respectively. 8.42% of isolates harbored all of the four genes. Coexistence of *exoS* and *exoU* was seen in 10.5% of the isolates. High resistance rates were seen for cefipime, Azteronam and Ofloxacin.

Conclusion: Considering the low prevalence of *exoS* in *P. aeruginosa* causing burn infection in comparison with other infections caused by this bacterium, it seems that this gene has a minor role in the *P. aeruginosa* pathogenesis isolated from burn infection. Instead, *exoT* and *exoY* were found in nearly all isolates and probably, these genes may have a greater role in burn infections.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Burn infection, Cytotoxins genes