پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال پانزدهم، شماره ۶، پی در پی ۷۸، صفحات ۲۸۷ تا۲۹۲
بهمن و اسفند ۱۳۸۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۲۷

تشخیص ملکولی و تعیین فاکتورهای ویرولانس سویه‌های *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از عفونتهای زخم و سوختگی

محمد مهدی اصلانی[1*]، زینب شرفی[2]، فرشته شاهچراغی[1]، وجیهه سادات نیک‌بین[3]، غلام حسین ابراهیمی‌پور[4]، مرجان‌هاشمی‌پور[5]

۱- دانشیار، بخش میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی, بخش میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشیار، میکروبیولوژیست، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۵- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز علوم تحقیقات، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در دهه‌های اخیر در پی درمان آنتی‌بیوتیکی، *سودوموناس آئروجینوزا* به عنوان یکی از مهمترین پاتوژنهای بیمارستانی شناسایی شد. به دلیل اهمیت کلینیکی سودوموناس آئروجینوزا روشهای متنوعی برای شناسایی آن به وجود آمده است. هدف از این مطالعه شناسایی سویه‌های *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از عفونتهای زخم و سوختگی بر اساس PCR ژن‌های اختصاصی لیپوپروتئینهای غشای خارجی (oprI و oprL) و اگزوتوکسین A (toxA) و تعیین فراوانی ژنهای ویرولانس آنزیمهای نورآمینیداز (nanI) و اگزوآنزیم S (exoS) در این سویه‌ها است.

مواد و روشها: این مطالعه با طراحی توصیفی مقطعی انجام شد. ۱۵۰ نمونه *سودوموناس آئروجینوزا* از عفونتهای زخم و سوختگی از بیمارستانهای امام خمینی، مطهری و توحید در تهران جمع آوری شدند. DNA این سویه‌ها با روش فنل- کلروفرم استخراج و PCR ژنهای oprI، oprL، toxA، exoS و nanI با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

یافته‌ها: همه ۱۵۰ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* مورد مطالعه دارای ژنهای oprI و oprL بودند. ۱۴۲(۹۴/۷٪) سویه دارایtoxA ، ۹۸ سویه (۶۵/۳۳٪) دارای exoS و ۱۹ سویه (۱۲/۶۶٪) دارای nan1 بودند. فراوانی ژن nan1 در ایزوله‌های زخم (۳۰٪) به صورت معنی‌داری بیشتر از ایزوله‌های سوختگی (۴٪) بود.

نتیجه‌گیری: به نظر میرسد که استفاده همزمان از پرایمرهای ژنهای oprI و oprL و toxA، حساسیت کافی را برای شناسایی *سودوموناس آئروجینوزا* از نمونه‌های کلینیکی فراهم میکند. فراوانی زیاد ژن exoS در این ایزوله‌ها منعکس‌کننده توانایی آنها برای عفونت تهاجمی است. فراوانی ژن nan1 در ایزوله‌های زخم نسبت به سوختگی بیانگر نقش احتمالی آن در عفونتهای زخم می‌باشد.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروجینوزا، اگزوتوکسین A، OprL, OprI، نورآمینیداز و اگزوآنزیم S، سوختگی، زخم.

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Aslani MM, Sharafi Z, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Ebrahimipour Gh, Hashemipour M. Molecular detection and identification of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound and burn infections. Pejouhandeh 2011;15(6):286-92.

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا پاتوژن فرصت‌طلبی است که در سالهای اخیر به عنوان یکی از مهمترین پاتوژنهای بیمارستانی شناسایی شده است(۱). این باکتری مسئول ۱۱ تا ۲۳ درصد از عفونتهای بیمارستانی بویژه در بیماران سیستیک فیبروزیس(cystic fibrosis, CF)، اشخاص دچار سوختگی یا دارای نقص سیستم ایمنی و افرادی که هوادهی مصنوعی می‌شوند، است (۴-۲). سپسیس ناشی از این باکتری یک عارضه جدی متعاقب عفونت سوختگی است (۵). خطر

*نویسنده مسؤول مکاتبات: تهران خیابان کارگر جنوبی، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران بخش میکروبشناسی؛ تلفن: ۶۶۴۰۵۵۳۵؛ پست الکترونیک: mmaslani@yahoo.com

سپسیس متناسب با درجهٔ عفونت زخم و سوختگی افزایش می یابد(۶). با توجه به کثرت عفونتهای ایجاد شده توسط این باکتری و مقاومت ذاتی آن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های معمول، مرگ و میر در بیماران با عفونتهای ناشی از این باکتری بسیار شایع است. برای مثال پنومونی بیمارستانی *سودوموناس آئروجینوزا* باعث ۷۰٪ مرگ و میر در بیماران می شود(۷و۸). مهمترین عاملی که میزان مرگ و میرایجاد شده توسط این باکتری را کاهش می دهد، تشخیص به موقع و در پی آن درمان آنتی‌بیوتیکی سریع و مناسب است (۱). OprI و OprL از لیپوپروتئین‌های تشکیل‌دهنده پمپهای تراوش (Efflux pump) در غشای خارجی *سودوموناس آئروجینوزا* به شمار می‌روند. OprI یک لیپوپروتئین با وزن مولکولی کم است که همیشه در جنس *سودوموناس* بیان می شود و تعداد آن در غشای خارجی این جنس زیاد است. OprL که پروتئین H2 نیز نامیده می شود توسط زنجیره‌های آسیل چرب به صورت کووالان به پپتیدوگلیکان متصل شده است. oprI برای شناسایی جنس *سودوموناس* و oprL برای شناسایی گونه *سودوموناس آئروجینوزا* به کار می‌روند. این دو ژن، کدکننده لیپوپروتئین‌های اصلی غشای خارجی هستند که در مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری نقش دارند (۵و۹).

علاوه بر این، این ارگانیسم به دلیل وجود فاکتورهای ویرولانس متعدد خارج سلولی و متصل به سلول می تواند طیف وسیعی از عفونتهای شدید ایجاد کند. اهمیت هر کدام از این فاکتورها وابسته به جایگاه و ماهیت عفونت است. به‌عنوان مثال ژن toxA اگزوتوکسین A (ETA) را کد می کند که موجب مهار بیوسنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی می شود. از این ژن نیز برای شناسایی *سودوموناس آئروجینوزا* استفاده می‌شود (۱۰). nan1 نورامینیداز (سیالیداز) را کد می‌کند. این آنزیم در مراحل ابتدایی عفونت و تشکیل بیوفیلم نقش دارد (۱۱). ExoS (اگزوآنزیم S) یک پروتئین دو عملکردی است که مانع از فاگوسیتوز باکتری توسط فاگوسیت‌ها می شود، در تهاجم باکتری به درون سلول‌های غیرفاگوسیتی نقش دارد و موجب القای آپوپتوزیس سریع در سلول‌های میزبان می‌شود (۸،۱۲و۱۳).

تست‌های بیوشیمیایی و کیت‌های تجاری مورد استفاده برای شناسایی *سودوموناس آئروجینوزا* وقت‌گیر، پرهزینه و فاقد دقت و حساسیت کافی هستند. از آنجا که انجام این تست‌ها، خواندن نتایج آنها و بهینه کردن شرایط آزمایشها به صورت دستی انجام می‌شود، بنابراین عاری از خطا نیستند (۱۴). در سالهای اخیر استفاده از تکنیکهای مولکولی مانند روش PCR برای شناسایی گونه‌های میکروبی بسیار توسعه یافته است. این روشها علاوه بر دقت و سرعت بیشتر نسبت به روشهای شناسایی فنوتیپی مشکلات مربوط به این روشها را نیز ندارند (۱۰).

با توجه به اهمیت پاتوژنز *سودوموناس آئروجینوزا* و ضرورت شناسایی سریع و به موقع این باکتری در درمان عفونتها، دراین پژوهش سویه‌های *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از عفونتهای زخم و سوختگی با استفاده از سه پرایمر oprI، oprL و toxA با روش PCR مورد شناسایی قرار گرفتند. حساسیت این پرایمرها برای شناسایی این باکتری با هم مقایسه شد. همچنین میزان فراوانی ژن دو فاکتور ویرولانس nan1 و exoS دراین سویه‌ها بررسی شدند.

مواد و روشها

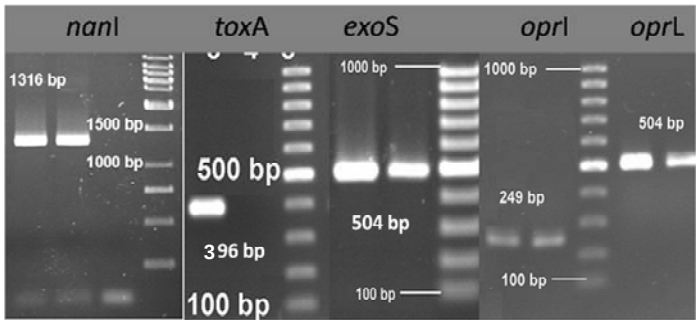
جمع آوری نمونه‌ها: این تحقیق به صورت مقطعی (cross-sectional) انجام شد. در این مطالعه ۱۵۰ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* جداشده‌از عفونتهای زخم و سوختگی از سه بیمارستان در تهران مورد بررسی قرار گرفتند که شامل ۵۰ سویه جدا شده از عفونتهای سوختگی از بیمارستان مطهری مربوط به سال ۱۳۸۰، ۵۰ سویه جدا شده از عفونتهای سوختگی از بیمارستان توحید مربوط به سال ۱۳۷۸ و ۵۰ سویه جدا شده از عفونتهای زخم از بیمارستان امام خمینی مربوط به سالهای ۱۳۸۵-۱۳۸۴می‌شدند.

روش تشخیص بیوشیمیایی: این سویه‌ها با استفاده از تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی شامل اکسیداز، رشد بر روی ستریماید آگار، رشد در ۴۲°C ،تست سیترات، MR-VP، بررسی Motility برروی محیط SIM، بررسی تخمیر بر روی TSI به عنوان *سودوموناس آئروجینوزا* شناسایی شدند (۱۵و ۱۶).

استخراج DNA: DNA این سویه‌ها به روش فنل-کلروفرم استخراج شد، به این صورت که سوسپانسیون باکتریایی در تامپون لیز (NaCl، EDTA ،Tris HCl)، SDS ۲۵٪ و پروتئیناز K، به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰°C انکوبه شد. سپس به آن مخلوط فنل–کلروفرم-ایزوآمیل الکل اضافه شد تا پروتئینها رسوب کرده و جدا شوند. DNA باکتریایی بدست آمده با اتانول سرد رسوب داده شد و در نهایت در تامپون TE حاوی RNase (EDTA و Tris HCl و RNase) حل شد. الکتروفورز DNAهای استخراج شده به وسیله ژل آگارز ۰/۸٪ به مدت ۵۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰V انجام شد.

PCR و پرایمرهای مورد استفاده: آزمون PCR جهت

بررسی وجود ژنهای oprI، oprL، toxA و nan1 با استفاده از پرایمرها و دماهای ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. از سویه *P. aeruginosa* ATTC 27853 به عنوان کنترل مثبت و *Echerichia coli* ATTC 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. مخلوط واکنش PCR شامل مقادیر زیر بود: ۰/۵ µl از DNA استخراج شده به PCR master mix با حجم نهایی ۲۵ µl (۲/۵ µl بافر PCR 10X، ۱/۵ µl از $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۶ µl از dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۰/۵ µl از هر پرایمر ۱۰پیکومول و ۰/۱ µl از آنزیم Taq پلیمراز (۵U/µl) اضافه شد. برای تعیین اندازه محصول PCR از سایز مارکر 100 bp DNA Ladder تهیه شده از شرکت (Fermentase, Lithuania) استفاده شد. محصول واکنش PCR در ژل آگاروز ۱٪ در ولتاژ ۹۰ V به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR ژنهای مورد بررسی برروی ژل آگارز ۱ درصد. سایز مارکر مورد استفاده در الکتروفورز ژن nanI مارکر 1Kb و در بقیه موارد 100 bp می‌باشد. اندازه باندهای مربوط به هر یک از ژنهای مورد مطالعه در تصویر ذکر شده است.

یافته‌ها

همه ۱۵۰ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از عفونتهای زخم و سوختگی دارای ژنهای *oprI* و*oprL* بودند (جدول ۱). در میان ۵۰ سویه جدا شده از عفونتهای زخم، ۴۵ (۹۰٪) دارای toxA و ۱۵ (۳۰٪) دارای nan1 و ۳۱(۶۲٪) دارای exoS بودند. از بین ۱۰۰ سویه جدا شده از عفونتهای سوختگی، ۹۷ (۹۷٪) دارای toxA، ۴ (۴٪) دارای nan1 و ۶۷ (۶۷٪) دارای exoS بودند. در مجموع از بین ۱۵۰ سویه سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از عفونتهای زخم و سوختگی ۱۴۲ (۹۴/۷٪) دارای toxA، ۱۹ (۱۲/۶۶٪) دارای nan1 و ۹۸ سویه(۶۵/۳٪) دارای exoS بودند (جدول ۲). آزمون آماری آنوای یک سویه برای بررسی تفاوت فراوانی این ژنها بین ایزوله‌های زخم و سوختگی استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که فراوانی ژن nan1 در ایزوله‌های زخم به صورت معنی‌داری بیشتر از ایزوله‌های سوختگی است ($p<0/05$).

جدول ۱: توالی پرایمرها و دماهای مورد استفاده در آزمون PCR ژنهای oprI، oprL، toxA، exoS و nan1

Target gene	Primer Sequence (5́-3́)	PCR Denaturation	PCR Annealing	PCR Extension	Cycles	Amlicon size	Reference
oprI	ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCTGCT CTTGCGGCTGGCTTTTTCCAG	94°C 40s	57°C 50s	72°C 20s	25	249 bp	(4)
oprL	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	94°C 40s	57°C 50s	72°C 50s	25	504 bp	(4)
toxA	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	94°C 1 min	68°C 1 min	72°C 1 min	35	396 bp	(12)
nan1	AGGATGAATACTTATTTTGAT TCACTAAATCCATCTCTGACCCGATA	94°C 30s	54°C 1 min	72°C 90s	30	1316 bp	(15)
exoS	CTTGAAGGGACTCGACAAGG TTCAGGTCCGCGTAGTGAAT	94°C 30s	54°C 1 min	72°C 1 min	35	504 bp	(15)

جدول ۲. فراوانی ژنهای toxA، exoS و nan1 در سویه‌های *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از عفونتهای زخم و سوختگی

ژن ویرولانس	زخم		سوختگی		p
	امام خمینی (n=۵۰)	مطهری (n=۵۰)	توحید (n=۵۰)	مجموع (n=۱۰۰)	
toxA+	۴۵ (۹۰)	۴۸ (۹۶)	۴۹ (۹۸)	۹۷ (۹۷)	۰/۲۴
exos+	۳۱ (۶۲)	۳۵ (۷۰)	۳۲ (۶۴)	۶۷ (۶۷)	۰/۴
nan1+	۱۵ (۳۰)	۳ (۶)	۱ (۲)	۴ (۴)	۰/۰۵*

اعداد داخل پرانتز ٪ هستند.
*: معنی‌دار

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که از بین ۱۵۰ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از عفونتهای زخم و سوختگی همگی دارای ژنهای oprI و oprL و ۹۴/۷٪ از آنها دارای ژن toxA بودند. Lavenir و همکاران نیز گزارش کردند که از بین ۵۹ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از منابع مختلف، ۵۵ سویه دارای toxA (حساسیت ۹۵٪) و همگی دارای oprI و oprL بودند (حساسیت ۱۰۰٪) (۳). Qin و همکاران گزارش دادند که از بین ۶۳ ایزوله *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از بیماران سیستیک فیبروزیس ۹۸/۴٪ دارای oprI و ۹۳/۷٪ دارای toxA بودند (۱۴).

Khan و Cerniglia گزارش دادند که از بین ۱۳۰ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از منابع مختلف ۹۶٪ دارای toxA بودند. اختصاصیت این تست ۱۰۰٪ بود (۱۰). Cornelis و همکاران گزارش دادند که از بین ۸۲ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از عفونتهای سوختگی همگی دارای ژن‌های oprI و oprL بودند (حساسیت ۱۰۰٪). اختصاصیت این تست ۷۴٪ بود (۵).

باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* به دلیل توانایی سازگاری با محیطها و میزبانهای مختلف، دارای تنوع ژنوتیپی زیادی است که منجر به واکنشهای فنوتیپی غیر معمول می شود از این‌رو تشخیص آنها توسط روشهای فنوتیپی، با خطا همراه می‌شود (۱۷،۱۴و۱۸). با اینکه شناسایی این باکتری به طور معمول وابسته به روشهای فنوتیپی که از دقیقترین روشهای شناسایی هستند می باشد، امروزه روشهای مولکولی از جمله PCR برای شناسایی ایزوله‌های غیرتیپیک مؤثرتر و دقیق ترند (۱۴). استفاده از PCR ژنهای اختصاصی مانند oprI و oprL در شناسایی باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* برای اولین بار در سال ۱۹۹۷توسط Cornelis و همکاران ارائه شد و استفاده از toxA نیز توسط Khan و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام شد (۱۰و۵).

این نتایج نشان می دهند که تشخیص *سودوموناس آئروجینوزا* به وسیله PCR ژن‌های oprI و oprL دارای حساسیت بیشتر و بر اساس ژن toxA دارای حساسیت کمتری است. اختصاصیت بالای آزمون PCR بر اساس ژن toxA به معنای وجود جواب مثبت کاذب کمتر است و این امر نشان دهنده این است که این ژن ویژه *سودوموناس آئروجینوزا*ست و در ژنوم گونه‌های دیگر شناسایی نشده است. تشخیص *سودوموناس آئروجینوزا* بر اساس ژن toxA دارای حساسیت کمتری است که به معنای وجود جواب منفی کاذب است که این امر به این دلیل است که برخی سویه‌های *سودوموناس آئروجینوزا* (حدود ۵٪) فاقد این ژن هستند که بیانگر بالا بودن تنوع ژنوتیپی این باکتری است و تشخیصهای مولکولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳و۱۴).

بنابراین به دلیل وجود جوابهای مثبت و منفی کاذب غیر قابل اجتناب ، استفاده از تنها یک ژن هدف برای شناسایی *سودوموناس آئروجینوزا* پیشنهاد نمی‌شود همانطور که استفاده از یک تست بیوشیمیایی برای شناسایی آن کافی و صحیح نیست. بنابراین استفاده از چندین ژن‌هدف برای شناسایی یک ارگانیسم، ضریب اطمینان را در ارائه نتایج افزایش خواهد داد (۱۴).

در این مطالعه ۱۵ (۳۰٪) از ۵۰ ایزوله زخم و ۴ (۴٪) از ۱۰۰ ایزوله سوختگی دارای ژن nan1 بودند. همانطور که در نتایج اشاره شد، فراوانی ژن nan1 در ایزوله‌های زخم به صورت معنی‌داری بیشتر از ایزوله‌های سوختگی بود ($p < ۰/۰۵$). چون تعداد ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه زیاد بود بنابراین تفاوت معنی دار شیوع ژن nan1 بین ایزوله‌های زخم و سوختگی منعکس کنندهٔ پراکنش واقعی این ژن در سویه‌های جدا شده از این دو نوع عفونت است. تفاوت معنی دار فراوانی ژن nan1 بین ایزوله‌های زخم و سوختگی *سودوموناس آئروجینوزا*نشان دهندهٔ نقش احتمالی نورامینیداز در عفونتهای زخم ایجاد شده توسط این باکتری است. بنابراین

سویه‌های دارای nan1 بودند بهتر می توانند با استفاده از این آنزیم در جراحات زخم استقرار یافته و ایجاد عفونت کنند. بیان این ژن در محیط دارای اسمولاریته ٔ بالا صورت می گیرد که احتمالاً این موقعیت در جراحات زخم وجود دارد (۲۰ و ۱۹). در مطالعه Lanotte و همکاران، از بین ۱۷ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از عفونت زخم ۷ (۴۱/۲٪) دارای nan1 بودند (۱۹).

در رابطه با فاکتور ویرولانس اگزوآنزیم S (ExoS) نیز در مطالعه‌ای که Feltman و همکاران بر روی ۱۱۵ ایزوله محیطی و کلینیکی مختلف *سودوموناس آئروجینوزا* انجام دادند، ۹ (۶۰٪) از۱۵ ایزوله عفونت زخم دارای exoS بودند (۷). در مطالعه که Lomholt و همکاران بر روی ۱۴۵ ایزوله محیطی و کلینیکی مختلف، تمامی (۱۰۰٪) سویه‌های ایزوله شده از عفونت زخم دارای ژن exoS بودند (۲۱). در مطالعه‌ای که توسط Lanotte و همکاران بر روی ۱۶۲ ایزوله محیطی و کلینیکی مختلف انجام شد،۱۱ سویه (۶۴/۷٪) از ۱۷ ایزوله زخم عفونی دارای exoS بودند (۱۹). در این مطالعه نیز ۹۸ سویه (۶۵/۳٪) دارای ژن exoS بودند.

نتایج متفاوت گزارش شده در این مطالعات، برای شیوع *ExoS* در ایزوله‌های زخم می تواند به دلیل کم بودن تعداد ایزوله‌های زخم مورد بررسی در آنها باشد. بیشتر ایزوله‌های زخم و سوختگی دارای exoS هستند که نشان می‌دهد این ژن نقش مهمی در این عفونتها دارد و فعالیت تهاجمی با واسطه ExoS ممکن است امتیازی برای *سودوموناس آئروجینوزا* در این نوع عفونتها باشد. با این وجود، برخی از ایزوله‌ها فاقد exoS هستند که نشان می‌دهد این ژن در این عفونتها ضروری نیست (۱۸). در مدلهای تجربی عفونت سوختگی، تولید ExoS با توانایی *سودوموناس آئروجینوزا* برای انتشار از جایگاههای کلونیزاسیون سلول‌های اپیتلیال و ایجاد عفونت سیستمیک ارتباط دارد (۲۲).

در انتها باید گفت که با توجه به مزایای روشهای ملکولی نسبت به روشهای بیوشیمیایی، استفاده از روشهای ملکولی در تشخیص باکتری‌های مولد عفونتهای بیمارستانی از جمله *سودوموناس آئروجینوزا* می‌تواند راهی مناسب و سریع در تشخیص عامل عفونت و در نتیجه انتخاب روش صحیح درمان و جلوگیری از عوارض بیشتر عفونت در بیماران شود. همچنین شناسایی عوامل مؤثر در بیماریزایی *سودوموناس آئروجینوزا* می‌تواند در انتخاب روشهای پیشگیری و درمان مناسب عفونتهای مختلف سودوموناس کاربرد داشته باشد.

نتیجه‌گیری

در انتها باید گفت که با توجه به مزایای روشهای ملکولی نسبت به روشهای بیوشیمیایی، استفاده از روشهای ملکولی در تشخیص باکتری‌های مولد عفونتهای بیمارستانی از جمله *سودوموناس آئروجینوزا* می‌تواند راهی مناسب و سریع در تشخیص عامل عفونت و در نتیجه انتخاب روش صحیح درمان و جلوگیری از عوارض بیشتر عفونت در بیماران شود. همچنین شناسایی عوامل مؤثر در بیماریزایی *سودوموناس آئروجینوزا* می‌تواند در انتخاب روشهای پیشگیری و درمان مناسب عفونتهای مختلف سودوموناس کاربرد داشته باشد.

REFERENCES

1. Jaffe R, Lane JD, Bates CW. Real-time identification of *Pseudomonas aeruginosa* direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR). J Clin Lab Anal. 2001;15(3):131-7.
2. Wendelboe A, Baumbach J. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by a contaminated cystoscope. New Mexico Epidemiol Rep 2007;6:1-4.
3. Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S, Cournoyer B. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the specific ecfx gene target. J Microbiol Methods 2007; 2007;70(1):20-9.
4. De Vos D, Bouton C, Sarniguet A, De Vos P, Vauterin M, Cornelis P. Sequence diversity of the oprI gene, coding for major outer membrane lipoprotein I, among rRNA group I pseudomonads. J Bacteriol 1998;180(24):6551-6.
5. Cornelis P, De Vos D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde Ch, 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 genes, oprI and oprL. J Clin Microbiol 1997;35(6):1295–99.
6. Pirnay JP, De Vos D, Duinslaeger L, Reper P, Vandenvelde C, Cornelis P, *et al.* Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture by rapid 'real-time' polymerase chain reaction. Crit Care 2000;4(4):255-61.
7. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser A. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa.* Microbiology 2001;147:2659-69.

8. Schulert GS, Fltman H, Rabin SDP, Martin CG, Battle SE, Rello J, et al. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. JID 2003;188:1695-706.

9. Mashouf RY, Zamani A, Farahani HS. Diagnostic multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of Pseudomonas aeruginosa from the skin biopsy specimens in burn wound infections and detection of antibiotic susceptibility. Saudi Med J 2008;29(8):1109-14.

10. 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.

11. Soong G, Muir A, Gomez MI, Waks J, Reddy B, Planet P, et al. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. J Clin Invest 2006;116(8):2297-305.

12. Winstanley C, Kaye SB, Neal TJ, Miksch S, Hart CA. Genotypic and phenotypic characteristics of Pseudomonas aeruginosa isolates associated with ulcerative keratitis. J Med Microbiol 2005;54(Pt 6):519-526.

13. Aiello D, Williams JD, Baranowska HM, Patel I, Peet NP, Huang J, et al. Discovery and Characterization of Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion. Antimicrob Agents Chemother, 2010;54:1988–99.

14. 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.

15. Howard BJ., Klaas J, Rubin SJ, Weissfeld A, Tilton RC. Clinical and Pathogenic Microbiology. Toronto: The C. V. Mosby Co.; 1987.

16. Winn WC Jr., Allen SD, Janda W, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.

17. Finnan S, Morrissey JP, O' Gara F, Boyad EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis and the hospital environment. J Clin Microbiol 2004;42(12):5783-92.

18. Spilker T, Coenye T, Vandemme P, Lipuma J. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2004;42:2074-9.

19. Lanotte Ph, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeu A, Quentin R. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. J Med Microbiol 2004;53(Pt 1):73-81.

20. Singh A, Goering R, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006;19(3):512-30.

21. Lomholt JA, Poulsen K, Kilian M. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. Infect Immun 2001;69(10):6284-95.

22. Fleiszig SMJ, Wiener-kronish JP, Miyazaki H, Valias V, Mostov KE, Kanada D, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasive correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. Infect Immun 1997;65:579-586.