فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۱ ص. ۲۶-۱۹

مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی ژن‌های *exoA* و *exoT* در سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها

شادی محبوبی، سمیه عطائی جلیسه*

گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): Atayi.somayeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1401.15.1.2.6 DOI:10.30495/JDB.2023.1968782.1333

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا باسیلی گرم منفی و یک پاتوژن فرصت طلب است.این باکتری سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است. اگزوآنزیم‌های T,S,U,Y به وسیله سیستم ترشحی نوع III که از فاکتورهای بیماریزای مهم این باکتری است و اگزوتوکسین A به وسیله سیستم ترشحی نوع II ترشح می‌شوند. سودوموناس آئروژینوزا به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها حساس نیست. همچنین استفاده‌ی بیش از حد و خود سرانه از آنتی بیوتیک‌ها، باعث ظهور سودوموناس آئروژینوزاهای مقاوم به چند دارو می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی فراوانی ژن‌های *exoA* و *exoT* درسویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌ها بود. در این تحقیق ۲۹ سویه‌ی باکتری سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بیمارستان رازی رشت، با استفاده از روش‌های متداول میکروبیولوژی تعیین هویت شدند و به همراه سویه استاندارد ATCC27853 مورد بررسی قرار گرفتند. مقاومت این سویه‌ها به ۶ نوع آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش انتشار از دیسک مشخص شد. سپس استخراج DNA و PCR جهت تعیین فراوانی ژن‌های *exoA* و*exoT* انجام شد. در این تحقیق بالاترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای ایمی پنم (۷۵/۸۶) مشاهده شد. نتایج به دست آمده از PCR نشان دهنده‌ی فراوانی۳۷/۹۳% برای *exoA* و ۶۸/۹۶% برای *exoT* بود.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، ژن exoA، ژن exoT، PCR

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی، هوازی، اکسیداز مثبت، غیر تخمیری، متحرک و میله‌ای شکل است که در محیط‌های وسیعی مانند آب، خاک، ریزوسفر و حیوانات زندگی می‌کند. همچنین به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب مکرر هم در حیوانات و هم در انسان شناخته می‌شود [۱]. سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب بزرگ انسانی است. تا حدی به دلیل مقاومت طبیعی آن در برابر آنتی بیوتیک‌ها و ضدعفونی کننده‌ها، منبع مهم عفونت‌های باکتریایی در بیماران بستری در بیمارستان مانند قربانیان سوختگی شدید است [۲]. سودوموناس آئروژینوزا برای افراد سالم بی ضرر است اما باعث عفونت‌های شدید در بیماران فیبروز کیستیک و افراد دارای نقص ایمنی

می‌شود [۳]. سودوموناس آئروژینوزا مسئول بیش از دو میلیون عفونت بیمارستانی، به ویژه در بیماران نقص ایمنی، و حدود ۹۰۰۰۰ مرگ در سال است [۴]. درمان آنتی بیوتیکی برای عفونت سودوموناس آئروژینوزا یک موضوع نگران کننده است زیرا به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها حساس نیست. استفاده بی رویه یا بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها ظهور سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو را تشدید می‌کند [۴]. این باکتری‌ها به دلیل نیازهای متابولیکی پایین، مقاومت در برابر مواد ضدعفونی کننده شیمیایی و مقاومت ذاتی یا اکتسابی در برابر عوامل ضد میکروبی، توانایی انتشار در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها را دارند. در سال‌های اخیر، اکثر سودوموناس آئروژینوزاها از نمونه‌های بالینی مقاوم به چند دارو (MDR) هستند [۵]. بیماریزایی در سودوموناس آئروژینوزا چندعاملی است که بر تنظیم ژن‌های مرتبط با بیماریزایی وبیان فاکتورهای مربوطه از جمله چسبنده‌ها، اگزوتوکسین‌ها، پروتنازها و رنگدانه‌ها تکیه دارد [۶]. عوامل بیماریزا می‌توانند شیمیایی یا پروتئینی باشند و یا مرتبط با سلول یا ترشح شوند [۷]. فاکتورهای ترشحی نوع III (T3SS)، فاکتورهای بیماریزای مهم در عفونت‌های حاد ناشی از سودوموناس آئروژینوزا هستند [۸] که از طریق انتقال حداکثر چهار اگزوتوکسین (*exo*S, *exo*U, *exo*T و *exo*Y) به سلول میزبان توسط زائده سوزنی مانند عمل می‌کند [۹]. پس از یک بار ورود اگزوتوکسین‌ها، نکروز سلولی و اسکلت سلولی آسیب می‌بیند، بنابراین پاتوژن قادر به حمله به سلول‌های میزبان است. *exo*S و *exo*T آنزیم‌های کاربردی زیستی هستند و فعالیتی موازی دارند. آنها در اسید آمینه ۷۵٪ یکسان هستند و فعالیت‌های پروتئین فعال کننده Gtpase (GAP) و ADP-ribosyltransferas (ADP-RT) را کد می‌کنند [۱۰]. دامنه‌های Rho-GAP این دو پروتئین، زیرمجموعه‌ای مشابه از GTPases، از جمله Rho، Rac1 و CDC42 را هدف قرار می‌دهند. فعالیت‌های RhoGAP و ADPR با هم عملکرد اسکلت سلولی سلول میزبان را تغییر می‌دهند و در نتیجه مهاجرت و چسبندگی سلول را مختل می‌کنند، علاوه بر آن فاگوسیتوز را مسدود می‌کنند، سدهای سلولی اپیتلیال را مختل می‌کنند و از بهبود زخم جلوگیری می‌کنند [۱۱]. *exo*A عضو اصلی سیستم ترشحی نوع II (T2SS) است که سنتز پروتئین را توسط ADP-ریبوزیلاسیون فاکتور طویل‌سازی ۲ یوکاریوتی مهار می‌کند [۱۲]. *exo*A فعالیت ADP-ribosyltransferase خود را بر روی فاکتور طویل‌سازی یوکاریوتی ۲ (eEF-2) اعمال می‌کند و نشان داده شده است که رشد سودوموناس آئروژینوزا را تسهیل می‌کند تا نفوذ به ریه، ایجاد اختلال در سد اپیتلیال ریه و نفوذپذیری پروتئین را با جلوگیری از روند بهبودی اتصال محکم، تقویت کند [۱۳]. هدف از این پژوهش بررسی فراوانی ژن‌های *exo*A و *exo*T در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا و بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

– نمونه‌های باکتریایی

در این تحقیق ۲۹ سویه ی باکتری سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بیمارستان رازی رشت با استفاده از روش‌های متداول میکروبیولوژی مشخص شدند و به همراه سویه استاندارد ATCC27853 مورد بررسی قرار گرفتند.

– جداسازی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

برای جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مجموع ۱۰۰ نمونه از منابع بالینی مختلف از بیمارستان رازی شهر رشت در سال ۱۴۰۰ جمع آوری شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و بر روی محیط‌های کشت ائوزین متیلن بلو (EMB) آگار، مک کانکی (Mac Conkey)، بلاد آگار (Blood Agar)، ستریماید آگار و سیمون سیترات (شرکت Merck، کشور آلمان) کشت داده شدند و پس از آنکوباسیون در دمای ۴۲ درجه ی سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، از نظر رشد و تشکیل کلنی و رنگ محیط و کلنی مورد بررسی قرار گرفتند. تست رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز، حرکت سولفید اندول (SIM)،اوره آز و تریپل شوگر آیرون آگار (TSI) (شرکت Merck، کشور آلمان) انجام شدند و در نهایت ۲۹ سویه ی سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شدند.

– آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از دیسک

در محیط مولر هینتون آگار(شرکت Ibresco، کشور ایران) مطابق دستور العمل موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) با دیسک‌های آنتی بیوتیک زیر انجام شد: سفپیم (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، ایمی پنم (10 µg) و سیپروفلوکساسین (۵ µg) (شرکت پادتن طب، کشور ایران).

- استخراج DNA

سویه‌های مورد مطالعه در محیط کشت نوترینت براث (شرکت Merck، کشور آلمان) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتیگراد ماندند. سپس به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰، سانتریفیوژ شدند و استخراج DNA با DNG-PLUS طبق دستورالعمل شرکت سازنده (شرکت سیناکلون، کشور ایران) انجام شد. برای اطمینان از استخراج صحیح DNA الکتروفورز DNAهای استخراج شده با ژل آگارز ۱ درصد انجام شد.

- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

واکنش PCR در حجم استاندارد ۲۰ میکرولیتر در حضور آنزیم مقاوم به دما، جفت پرایمر و DNAی الگو به کمک PCR master mix 2X (سیناکلون، ایران) در دستگاه ترموسایکلر (شرکت Kyratec، کشور استرالیا) طبق برنامه دمایی جدول ۲ انجام شد (۱۴،۱۵).

- الکتروفورز محصول PCR

با استفاده از بافر TBE و پودر آگارز ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه شد و ۸ میکرولیتر از محصول PCR با Loading baffer مخلوط شد و به درون چاهک‌ها تزریق شد. از DNA Ladder برای تعیین اندازه ی باندها استفاده شد. پس از ۲۰ دقیقه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت باندهای محصول PCR مشاهده شد.

نتایج

- آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به صورت آمیکاسین ۱۱ (۳۷/۹۳)، سفپیم ۲۱ (۷۲/۴۱)، سفتازیدیم ۲۰ (۶۸/۹۶)، سیپروفلوکساسین ۱۴ (۴۸/۲۷)، جنتامایسین ۶ (۲۰/۶۸)، ایمی پنم ۲۲ (۷۵/۸۶) مشاهده شد. جدول ۳ نتایج حاصل از آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی را نشان می‌دهد. شکل ۱ آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی یکی از سویه‌ها را نشان می‌دهد.

- نتایج حاصل از PCR

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *exo*A و *exo*T (باندهای ژن‌های *exo*A و *exo*T در سویه‌های مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد) در شکل‌های ۲ تا ۵ نشان داده شده است.طول باندهای ژن *exo*A برابر با ۳۵۲ و طول باندهای ژن *exo*T برابر با ۱۵۲ بود. ۱۱سویه دارای ژن *exo*A (۳۷/۹۳%) و۲۰سویه دارای ژن *exo*T (۶۸/۹۶%) بودند. در نتیجه شیوع ژن *exo*A ۳۷/۹۳ دصد و شیوع ژن *exo*T ۶۸/۹۶ درصد بود. سویه ی استاندارد هم دارای هر دو ژن بود.

جدول ۱. مشخصات پرایمرها

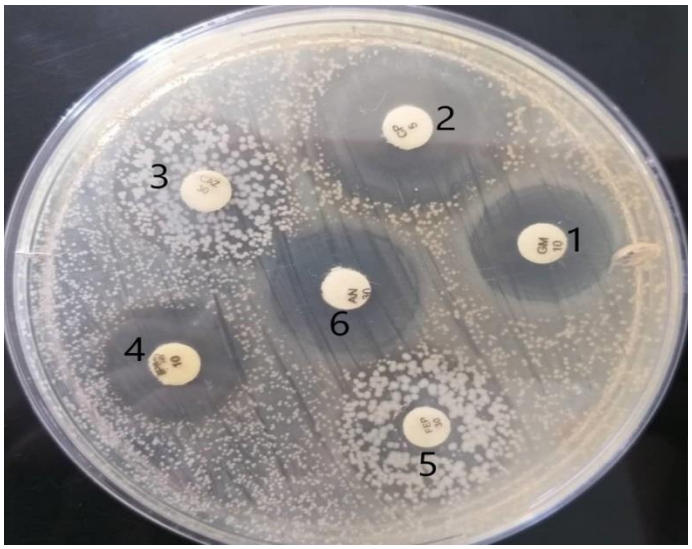
نام ژن	طول قطعه bp	توالی DNA پرایمر (5´→3´)	Reference
*exo*A	۳۵۲	F=GGTAACCAGCTCAGCCACAT R=TGATGTCCAGGTCATGCTTC	[۱۴]
*exo*T	۱۵۲	F=AATCGCCGTCCAACTGCATGCG R=TGTTCGCCGAGGTACTGCTC	[۱۵]

جدول ۲. برنامه دستگاه ترموسایکلر

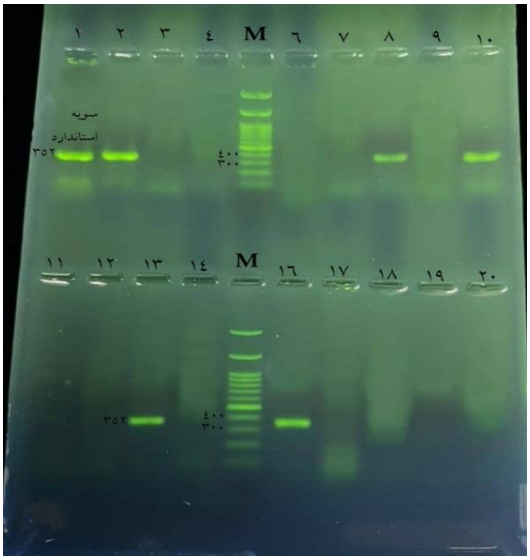
نام ژن	دناتوراسیون اولیه	دناتوراسیون	اتصال پرایمر	گسترش	تعدادسیکل	گسترش نهایی	Reference
*exo*A	۹۴°C-۳دقیقه	۹۴°C-۳۰ثانیه	۵۵°C ۱دقیقه	۷۲°C ۱دقیقه	۳۰	۷۲°C ۵دقیقه	[۱۴]
*exo*T	۹۴°C-۳دقیقه	۹۴°C-۴۰ثانیه	۵۸°C ۴۰ثانیه	۶۸°C ۱دقیقه	۳۶	۶۸°C ۷دقیقه	[۱۵]

جدول ۳. نتایج حاصل از آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی

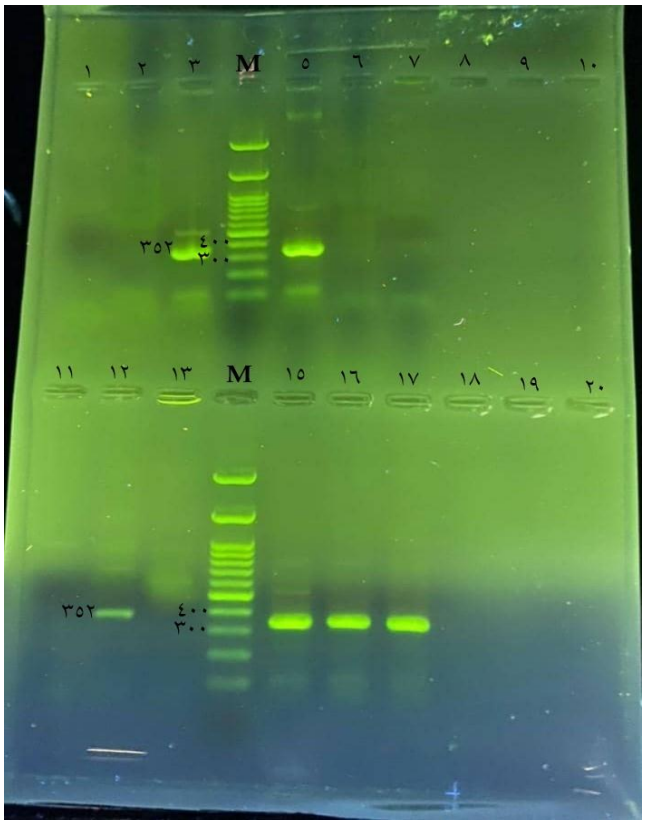
نوع آنتی بیوتیک	حساسیت	بینابینی	مقاومت
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
آمیکاسین	(۶۲/۰۶)۱۸	(۰)۰	(۳۷/۹۳)۱۱
سفپیم	(۲۴/۱۳)۷	(۳/۴۴)۱	(۷۲/۴۱)۲۱
سفتازیدیم	(۲۷/۵۸)۸	(۳/۴۴)۱	(۶۸/۹۶)۲۰
سیپروفلوکساسین	(۲۰/۶۸)۶	(۳۱/۰۳)۹	(۴۸/۲۷)۱۴
جنتامایسین	(۷۵/۸۶)۲۲	(۱/۴۴)۱	(۲۰/۶۸)۶
ایمی پنم	(۶/۸۹)۲	(۱۷/۲۴)۵	(۷۵/۸۶)۲۲



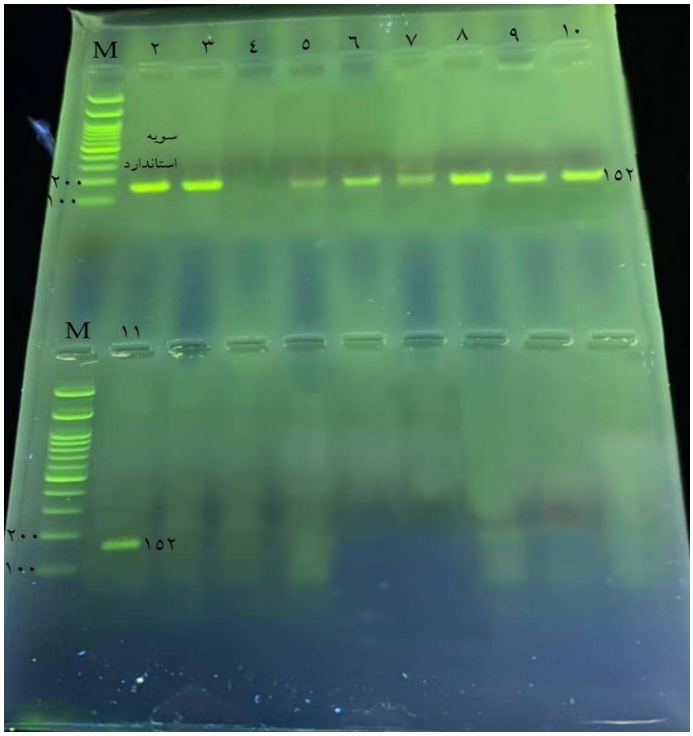
شکل ۱. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی یکی از سویه ها
(۱:جنتامایسین)،(۲:سیپروفلوکساسین)،(۳:سفتازیدیم)،(۴:ایمی پنم)،(۵:سفپیم)،(۶:آمیکاسین)



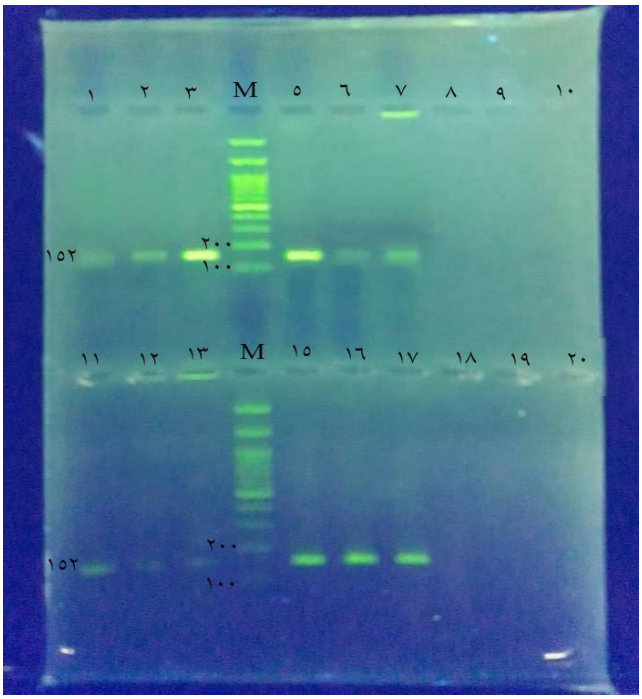
شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR ژن *exo*A (باندهای *exo*A در سویه‌های مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، چاهک‌های ۱۶،۱۳،۱۰،۸،۲،۱ باند *exo*A داشتند. چاهک M چاهک دارای DNA Ladder است.)



شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR ژن *exo*A (باندهای *exo*A در سویه‌های مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، چاهک‌های ۱۷،۱۶،۱۵،۱۲،۵،۳ باند *exo*A داشتند. چاهک M چاهک دارای DNA Ladder است.)



شکل ۴. الکتروفورز محصول PCR ژن *exo*T (باندهای *exo*T در سویه‌های مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، چاهک‌های ۱۱،۱۰،۹،۸،۷،۶،۵،۳،۲ باند *exo*T داشتند. چاهک M دارای DNA Ladder است.)



شکل ۵. الکتروفورز محصول PCR ژن *exo*T (باندهای *exo*T در سویه‌های مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، چاهک‌های ۱،۲،۳،۵،۶،۷،۱۱،۱۲،۱۳،۱۵،۱۶،۱۷ باند *exo*T داشتند. چاهک M دارای DNA Ladder است.)

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی، غیر تخمیری میله ای است که در همه جا حاضر است، یک پاتوژن فرصت طلب باکتریایی معمولی که اغلب در محیط بیمارستان یافت می‌شود. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های انسانی هستند که بیشتر در بین بیماران بستری در بیمارستان رخ می‌دهد. بنابراین، سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا یکی از باکتری‌های اغلب جدا شده از نمونه‌های بالینی هستند [۱۶]. شیوع سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو در سرتاسر جهان رخ داده است [۱۷]. عفونت‌های ناشی از ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو (MDR) با طول مدت طولانی‌تر بستری، افزایش هزینه‌ها، و همچنین افزایش میزان عوارض و مرگ و میر همراه است [۱۸]. عفونت موفقیت آمیز سودوموناس آئروژینوزا در میزبان‌های مختلف به دلیل وجود فاکتورهای بیماریزای فراوان از جمله سیستم‌های ترشحی نوع III (T3SS)، تحرک، پروتئازها و اگزو پلی ساکاریدها در نظر گرفته شده است [۱۹]. تعدادی اگزوتوکسین از طریق T3SS از طریق تماس با سلول به داخل سیتوپلاسم سلول میزبان ترشح می‌شود. توکسین‌های ترشح شده(پروتئین‌های موثر) شناسایی شده اند و چهار پروتئین یا توکسین مشتق شده از T3SS شامل اگزوآنزیم S (*exo*S)، اگزوآنزیم T (*exo*T)، اگزوآنزیم U (*exo*U) و اگزوآنزیم Y (*exo*Y) هستند [۲۰]. *exo* T یک پروتئین با وزن مولکولی ۵۳ کیلو دالتون است که روی آپوپتوز کار می‌کند، اسکلت سلولی اکتین را تغییر می‌دهد، از فاگوسیتوز جلوگیری می‌کند و از مهاجرت سلولی جلوگیری می‌کند [۲۰].

فاکتور اصلی بیماریزای تولید شده توسط اکثر جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا اگزوتوکسین A (ETA) است که نقش عمده ای در پاتوژنز عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم دارد [۲۱]. در مطالعه‌ای توسط مختاری و همکاران در نمونه‌های انسانی مقاومت به سفتازیدیم (۶٪/۶)، ایمی‌پنم (۸۳٪/۴)، سیپروفلوکساسین (۱۰٪)، آمیکاسین (۱۰۰٪)، جنتاماسین (۶۶٪/۷) و حساسیت به سفتازیدیم (۹۳٪/۴)، ایمی پنم (۱۶٪/۶)، سیپروفلوکساسین (۹۰٪)، آمیکاسین (۰٪) و جنتامایسین (۳۳٪/۳) بود [۱۴]. در مطالعه‌ای دیگر توسط Elmouaden و همکاران در سال ۲۰۱۹، مقاومت به سفتازیدیم (۵/۸%)، ایمی‌پنم (۷/۷%)، سیپروفلوکساسین (۱۱%)، آمیکاسین (۰/۶%) و حساسیت به سفتازیدیم (۹۴٪/۲)، ایمی پنم (۹۲٪/۳)، سیپروفلوکساسین (۸۹٪)، آمیکاسین (۹۹٪/۴) یافت شد [۲۲]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین میزان

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مربوط به آنتی بیوتیک ایمی پنم (% ۷۵/۸۶) و بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی مربوط به آنتی بیوتیک جنتمایسین (۷۵/۸۶٪) بود. علت عدم تطابق نتایج مطالعه‌ی حاضر با دو مطالعه ی ذکر شده می‌تواند به دلیل تفاوت منطقه‌ی جغرافیایی، تفاوت رعایت مسائل بهداشتی در بیمارستان‌های مختلف و تفاوت سویه‌های حساس و مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها در مناطق مختلف باشد.

در مطالعه‌ای توسط Morshedi و همکاران در سال ۲۰۲۲ توزیع مولکولی نشان داد که ۷۵/۴ درصد از جدایه‌ها حامل ژن *exo*A بودند. واکنش Multiplex PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن *exo*A نشان داد که درصد بالایی از نمونه‌ها حاوی ژن *exo*A هستند [۲۳]. در مطالعه‌ای توسط GHazaei فراوانی ژن *exo*A برابر با ۸۳/۳۳ درصد بود [۲۴]. در مطالعه حاضر فراوانی ژن *exo*A برابر با ۳۷/۹۳ به دست آمد. علت این تفاوت‌ها در فراوانی می‌تواند به دلیل تفاوت منطقه ی جغرافیایی و همچنین تفاوت در منابع سویه‌های باکتریایی باشد.

در مطالعه‌ای توسط رحمتی و همکاران تمامی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به دست آمده از محیط سوختگی و بیمارستان دارای ژن *exo*T بودند [۵]. در مطالعه ای توسط Sarges و همکاران فراوانی ژن *exo*T در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا ۹۵/۹ درصد بود [۹]. در مطالعه حاضر فراوانی ژن exoT برابر با ۶۸/۹۶ به دست آمد. در واقع بیشتر سویه‌ها دارای این ژن بودند اما تفاوت در این فراوانی‌ها می‌تواند به علت تفاوت در تعداد نمونه‌های مورد مطالعه در هر تحقیق و همچنین منبع نمونه باشد. درواقع مشخص است که در نمونه‌های به دست آمده از بیماران سوختگی فراوانی اگزوآنزیم‌ها بیشتر است.

نتیجه گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مربوط به آنتی‌بیوتیک ایمی پنم (% ۷۵/۸۶) و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک جنتامایسین (% ۲۰/۶۸) بود.

همچنین ژن *exo*T در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در استان گیلان فراوانی بالایی داشت و فراوانی آن ۶۸/۹۶ درصد به دست آمد. ژن *exo*A در تعداد کمتری از سویه‌ها نسبت به ژن *exo*T وجود داشت و فراوانی آن ۳۷/۹۳ به دست آمد.

References

[1] Firouzi-Dalvand L, Pooladi M, Nowroozi J, Akhvan-Sepahi A, Hooshiyar M. Presence of *exo*U and *exo*S Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Urinary Tract Infections. Infect Epidemiol Med. 2016; 2(2): 8–11.

[2] Würtele M, Renault L, Barbieri JT, Wittinghofer A, Wolf E. Structure of the ExoS GTPase activating domain. FEBS Lett. 2001; 491(1–2): 26–9.

[3] Pang Z, Gu M Di, Tang T. *Pseudomonas aeruginosa* in Cancer Therapy: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. Front Oncol. 2022; 12(April).

[4] Sung K, Chon J, Kweon O, Nho S, Kim S, Park M, et al. Dynamic adaptive response of *pseudomonas aeruginosa* to clindamycin/ rifampicin-impregnated catheters. Antibiotics. 2021; 10(7).

[5] Rahmati M, Mansouri S, Sharifi H. Resistance to antimicrobial agents, chemical disinfectants and distribution of effectors proteins of type three secretion system in *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and hospital environments in south east of Iran. Acta Med Iran. 2020; 58(7): 345–51.

[6] Rodrigues YC, Furlaneto IP, Pinto Maciel AH, Garcia Quaresma AJP, de Matos ECO, Conceição ML, et al. High prevalence of atypical virulotype and genetically diverse background among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a referral hospital in the Brazilian Amazon. PLoS One. 2020;15(9 September): 1–21.

[7] Azimi, Hossein SK, Hossein BB, Saeed S, Khadijeh N, Mohammad A, et al. Presence of *exo*Y , *exo*S , *exo*U and *exo*T genes , antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. GMS Hyg Infect Control. 2016; 11:1–6.

[8] Shafikhani SH, Morales C, Engel J. The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin *exo*T is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. Cell Microbiol. 2008; 10(4): 994–1007.

[9] Sarges EDSNF, Rodrigues YC, Furlaneto IP, de Melo MVH, Brabo GL da C, Lopes KCM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system virulotypes and their association with clinical features of cystic fibrosis patients. Infect Drug Resist. 2020; 13: 3771–81.

[10] Joodzadeh M, Sheikh AF, Shahin M, Tavakol H. Available online at www.ijmrhs.com ISSN No : 2319-5886 Correlation of Frequency of *Pseudomonas Aeruginosa* and *exo*S & *exo*U Genes and Their Antibiotic Sensitivity Pattern in Specimen Isolated from ICU Ward Pulmonary Division, Emam Khomeini Hospital, Ahvaz. 2016; 248–54.

[11] Sun Y, Karmakar M, Taylor PR, Rietsch A, Pearlman E. *exo*S and *exo*T ADP Ribosyltransferase Activities Mediate *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis by Promoting Neutrophil Apoptosis and Bacterial Survival . J Immunol. 2012; 188(4): 1884–95.

[12] Yousefi-Avarvand A, Khashei R, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Emami A, Zomorodian K, Motamedifar M. The Frequency of Exotoxin A and Exoenzymes S and U Genes Among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran. Int J Mol Cell Med [Internet]. 2015; 4(3): 167–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629485%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4644528

[13] Aljohmani A, Opitz B, Bischoff M, Yildiz D. *Pseudomonas aeruginosa* Triggered Exosomal Release of ADAM10 Mediates Proteolytic Cleavage in Trans. Int J Mol Sci. 2022; 23(3).

[14] Mokhtari K, Amini K. Identification of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human and animal samples by multiplex-PCR and their antibiotic resistance pattern. Iran J Med Microbiol. 2019; 13(4): 294–301.

[15] Gawish AA. An investigation of type 3 secretion toxins encoding-genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a University Hospital in Egypt. J Microbiol Infect Dis. 2013; 03(03): 116–22.

[16] Bogiel T, Depka D, Rzepka M, Kwiecińska-Piróg J, Gospodarek-Komkowska E. Prevalence of the genes associated with biofilm and toxins synthesis amongst the *pseudomonas aeruginosa* clinical strains. Antibiotics. 2021; 10(3): 1–14.

[17] Sawa T, Momiyama K, Mihara T, Kainuma A, Kinoshita M, Moriyama K. Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. Microbiol Immunol. 2020; 64(5): 331–44.

[18] Hassuna NA, Mandour SA, Mohamed ES. Virulence constitution of multi-drug-resistant *pseudomonas aeruginosa* in upper Egypt. Infect Drug Resist. 2020; 13: 587–95.

[19] Zhang P, Guo Q, Wei Z, Yang Q, Guo Z, Shen L, et al. Baicalin represses type three secretion system of *pseudomonas aeruginosa* through pqs system. Molecules. 2021; 26(6).

[20] Mohammed EA, Al-dulaimi AA, Saleem AJ. Molecular study of the third secretion system in *pesudomonas aeruginosa* isolated from various clinical sources. 2020; 7327(April): 7321–7.

[21] Corehtash ZG, Khorshidi A, Firoozeh F, Akbari H, Aznaveh AM. Biofilm formation and virulence factors among *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(10).

[22] Elmouaden C, Laglaoui A, Ennanei L, Bakkali M, Abid M. Virulence genes and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in the Northwestern of Morocco. J Infect Dev Ctries. 2019; 13(10): 892–8.

[23] Hadi V, Isvand A, Saadati MR, Maleki H. Tips 1. 2022; 8(1): 51–6.

[24] Ghazaei C. Molecular Analysis of Pathogenic Genes (*las*B and *exo*A) in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Animal and Human Samples and Determination of Their Resistance Pattern. J Clin Res Paramed Sci. 2021; In Press (In Press).

Journal of Developmental Biology
Vol. 15, No. 1, Winter 2023

Investigation of the frequency of *exo*A and *exo*T *genes* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance of strains

Mahboubi Sh., Ataei-e Jaliseh S.*

Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

* (Corresponding author): Atayi.somayeh@yahoo.com

DOI:10.30495/JDB.2023.1968782.1333 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1401.15.1.2.6

Received: November 2022 Accepted: December 2022

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacillus and an opportunistic pathogen. This bacterium is the third most common cause of nosocomial infections. Exoenzymes T, S, U, Y are secreted by the type III secretion system, which is one of the important pathogenic factors of this bacterium, and exotoxin A is secreted by the type II secretion system. In this study, the frequency of *exo*A and *exo*T genes in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the antibiotic resistance of the strains were investigated. 29 strains of *P. aeruginosa* bacteria were identified from patients admitted to Razi Hospital in Rasht, using common microbiology methods and were examined along with the standard strain of ATCC27853. The resistance of these strains to 6 types of antibiotics was determined using disk diffusion method. Then DNA extraction and PCR was performed to determine the frequency of *exo*A and *exo*T genes. In this research, the highest rate of antibiotic resistance was observed for Imipenem(86.75). The results obtained from PCR showed a frequency of 37.93%for *exo*A and 68.96% for *exo*T.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *exo*A gene, *exo*T gene, PCR.