دانشکده دامپزشکی

سال تحصیلی: ۹۲-۱۳۹۱ شماره پایان نامه: ۹۰-۱

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای تخصصی میکروبیولوژی
DVSc

عنوان:

همسانه سازی قسمت ایمنی زای اگزوتوکسین A از سودوموناس آئروژینوزا و مطالعه اثر محافظتی آن به عنوان DNA واکسن در برابر باکتری در موش

نگارنده:

سحر نوری قراجلر

هئیت محترم داوران:

سرکار خانم دکتر ملاحت احمدی، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
استاد راهنما و رئیس هیئت داوران

جناب آقای دکتر شهرام شهابی، دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
استاد راهنما

جناب آقای دکتر بهمن حسینی ، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
استاد مشاور

سرکار خانم دکتر نیما حسینی جزنی، دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
داور

جناب آقای دکتر پیمان زارع، استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز
داور

جناب آقای دکتر عبدالغفار اونق، استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
داور

جناب آقای دکتر نوروز دلیرژ، استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
داور

فهرست مطالب

فصل اول:

مقدمه ٤

فصل دوم:

کلیات ٧
١- ٢ - جنس سودوموناس ٨
٢- ٢- سودوموناس آئروژینوزا ٩
٣- ٢- پاتوژنز ١٠
٢ -٤- بیماری‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا ١٣
١-٤- ٢- دستگاه تنفس ١٣
٢-٤-٢- باکتریمی ١٣
٣-٤-٢- آندوکاردیت ١٣
٤-٤-٢- سیستم عصبی مرکزی ١٣
٥-٤-٢- گوش ١٤
٦-٤-٢- چشم ١٤
٧-٤-٢- استخوان ها و مفاصل ١٤
٨-٤-٢- دستگاه گوارش ١٤
٩-٤-٢- عفونت دستگاه ادراری ١٤
١٠-٤-٢-پوست ١٥
٥-٢- عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در حیوانات ١٥
٦-٢- اگزوتوکسین A ١٧
١- ٦-٢- سمیت ١٧
٢- ٦-٢- ارتباط بین ساختار و فعالیت توکسین ١٨
٣- ٦-٢- نقش اگزوتوکسین A در عفونت زایی ١٨
٧- ٢- مقاومت‌های آنتی بیوتیکی ١٩
٨- ٢- تشخیص ١٩

۹- ۲- مقاومت ۲۰
۱۰-۲- نقش سودوموناس آئروژینوزا در عفونت‌های پوست و سوختگی ۲۰
۱-۱۰- ۲- تقسیم بندی سوختگی‌ها ۲۱
۲-۱۰- ۲- پاتوفیزیولوژی سوختگی‌ها ۲۲
۳-۱۰- ۲- اهمیت اندازه سوختگی ۲۳
٤-۱۰- ۲- اهمیت محل سوختگی ۲۳
٥-۱۰- ۲- تقسیم بندی سوختگی‌ها بر اساس شدت ۲٤
٦-۱۰- ۲ عفونت در جراحات ناشی از سوختگی ۲٥
۷-۱۰- ۲ انواع عفونت‌ها در جراحات سوختگی ۲٦
۸-۱۰- ۲ ریسک فاکتورهای توسعه عفونت در جراحات ناشی از سوختگی ۲٦
۹-۱۰- ۲- سودوموناس آئروژینوزا و نقش آن در سوختگی‌ها ۲٦
۱۰-۱۰- ۲ مدیریت سوختگی ۲۷
۱۱-۲- درمان عفونت‌های سودوموناسی ۲۸
۱۲--۲- پیشگیری از عفونت‌های سودوموناسی ۳۰
۱-۱۲-۲- واکسیناسیون ۳۰
۲-۱۲-۲- مزایا و معایب DNA واکسن‌ها ۳۱
۳- ۱۲-۲ راه‌های تجویز DNA واکسن‌ها ۳۲
٤- ۱۲-۲ – پاسخ‌های ایمنی که توسط DNA واکسن‌ها برانگیخته می شوند ۳٤
۱۳-۲- تاریخچه ایمونوتراپی سودوموناس ۳٥

فصل سوم:

۳- مواد و روش کار ٤٥
۱-۳ – مواد و وسایل مورد نیاز ٤٦
۲-۳ – روش ها ٥۱
۱- ۲ – ۳ شناسایی و تائید سویه ٥۱
۲- ۲- ۳- استخراج ژنوم سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO_1 ٥۱
۳- ۲-۳- اثبات استخراج DNA کروموزومی ٥۲
٤- ۲-۳- تکثیر دومین ایمنی زای اگزو توکسین A از سودوموناس آئروژینوزا ٥۳
٥- ۲-۳- استخراج باند مربوط به دومین ایمنی زای اگزوتوکسین A از ژل ٥٤

٦-٢-٣- آماده‌سازی پلاسمید ٥٥
٧- ٢-٣- هضم آنزیمی pET28a و محصول PCR ٥٦
٨-٢-٣- الحاق محصول PCR و پلاسمید ٥٦
٩-٢-٣- ترنسفورماسیون ٥٦
١٠-٢-٣- تست های تایید کلونینگ ٥٧
٣-٣- موش‌ها ٦٠
١-٣-٣- پروتکل واکسیناسیون ٦٠
٢- ٣-٣- ایجاد سوختگی درجه سه در موش‌ها ٦٠
٣-٣-٣- کشت میکروبی کبد، طحال، خون و اخذ سواب از محل سوختگی ٦١
٤- ٣-٣- روش انجام آزمون الایزا ٦١
٥- ٣-٣- تست بررسی میزان مرگ و میر ٦٣
٤-٣- روش‌های آماری ٦٣

فصل چهارم:

نتایج ٦٤

فصل پنجم:

بحث و نتیجه گیری و پیشنهادات ٧٧
خلاصه فارسی ٨٤
خلاصه انگلیسی ٨٥

فصل ششم:

منابع ٨٧

فصل اول

مقدمه

مقدمه:

در سال‌های اخیر مهندسی بر پایه ژنتیک باکتری‌ها علم زیست شناسی را متحول ساخته است. با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک قطعات خاص DNA را می توان جدا کرده، تکثیر نمود و ژن‌های آن‌ها را به میزان بالایی بیان کرد. با استفاده از عمل برشی آنزیم‌های قطعه‌بر که برای توالی‌های ویژه‌ای اختصاصی هستند می‌توان قطعاتی از DNA را بدست آورد که حاوی ژن‌ها یا قسمتی از ژن ها باشد و آن‌ها را به صورت کووالان به پلاسمیدها (ناقلین) متصل ساخت تا وارد باکتری‌های میزبان شوند. مجموعه‌های باکتری‌ها یا کلون‌ها که حاوی ژن‌های خاصی هستند را با استفاده از هیبریداسیون DNA یا RNA یا نشانگرهای شیمیایی یا شیمیایی رادیواکتیو می‌توان شناسایی نمود. همچنین پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌ها را به وسیله فعالیت آنزیم یا روش های ایمونولوژیک می توان از هم تشخیص داد.

تولید آنتی بادی‌های تک دودمانی که به طور کاملا اختصاصی به شاخص‌های آنتی ژنی روی پروتئین‌ها متصل می شوند، بسیار گسترش یافته‌اند. بنابراین روش‌های مهندسی ژنتیک را می توان برای جداسازی تقریبا تمام ژنهایی که ویژگی بیوشیمیایی قابل تشخیص دارند بکار برد.

بسیاری از آنزیم‌های قطعه بر، DNA را به صورت نامتقارن برش می‌دهند و قطعاتی تولید می‌کنند که دارای انتهاهای چسبنده هستند و ممکن است با یکدیگر دورگه سازی شوند. از این DNA می توان به عنوان یک دهنده با یک پلاسمید پذیرنده برای تولید پلاسمیدهای نوترکیب مهندسی ژنتیک استفاده کرد.

برش یک پلاسمید (یک قطعه DNA حلقوی) با استفاده از آنزیم مشابه باعث تولید یک قطعه خطی با انتهاهای چسبنده مشابه یکدیگر میشود. پلاسمیدهای نوترکیب را می‌توان به یک باکتری میزبان، معمولا ای کولای، به وسیله ترانسفورماسیون وارد کرد. سلول‌های ترانسفورم شده را می‌توان بر اساس وجود مقاومت در برابر یک یا چند دارو که به وسیله ژن‌های پلاسمید کد می شوند، انتخاب نمود. ایجاد منفذ با استفاده از جریان الکتریسیته یک روش جدید برای وارد کردن DNA به باکتری‌هاست. ابداع این روش احتمال استفاده از باکتری‌های مختلف به عنوان میزبان برای ژن‌های عمل آوری شده را قوت بخشیده است.

روش‌های مهندسی ژنتیک، جداسازی و بیان کاملا مستقل ژن های مرتبط با عوامل بیماریزا را امکانپذیر ساخته است. واکسن‌های تهیه شده به وسیله ژن‌های مهندسی شده بی خطر و امن هستند.

برای مثال یک واکسن را می توان علیه یک پروتئین پوشش ویروس تهیه کرده بدون اینکه ژن‌های مربوط به عملکردهای تکثیر ویروس وجود داشته باشد. بنابراین تلقیح چنین واکسنی به هیچ وجه خطر ورود ویروس بیماری زا را به دنبال نخواهد داشت.

واکسن‌های تهیه شده از DNA یکی از جدیدترین روش‌های واکسیناسیون می باشد. تلقیح پلاسمیدی که دارای cDNA کد کننده آنتی ژن پروتئینی است، پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال قوی و بلند

مدتی را علیه آنتی ژن برمی انگیزد. احتمالا برخی از سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی ژن به این پلاسمیدها آلوده شده و پپتیدهای ایمونوژن را که پاسخ‌های اختصاصی را بر می انگیزد، بروز می دهد.
خاصیت منحصر به فرد واکسن‌های DNA این است که تنها توسط این واکسن‌ها می توان بدون استفاده از میکروب‌های زنده پاسخ‌های CTI قویی را ایجاد نمود. هنوز معلوم نیست تا چه مدت DNA پلاسمیدی در بدن میزبان فعال باقی می ماند. چه سلول‌هایی را باید در بدن موجود زنده آلوده نمود تا پاسخ‌های ایمنی ایجاد شوند و یا حتی پاسخ‌ها در کجا شکل می‌گیرند (در ناحیه تلقیح یا در گره‌های لنفاوی درناژکننده). بنابراین سادگی دستکاری cDNA به منظور تولید انواع آنتی ژن‌ها و توانایی بروز توام سایر پروتئین‌هایی که پاسخ‌های ایمنی را تقویت می کنند، آینده روشنی را برای این روش رقم زده است.

سودوموناس آئروژینوزا یک جرم بیماریزای فرصت طلب است که بعنوان یک علت اصلی عفونت در افراد دچار نقص ایمنی مطرح است.

درسالهای اخیر رهیافت‌هایی برای پیش‌گیری از عفونت‌های سودوموناسی بکار رفته از جمله استفاده از اجزاء غشاء خارجی یا پروتئین‌های ترشحی مثل لیپوپلی‌ساکاریدها، توکسوئیدها، تاژک، پیلی و اجزا غیر سمی. اگر چه از میان تمامی فاکتورهای حدت مرتبط با سودوموناس آئروژینوزا، اگزوتوکسین A از همه سمی‌تر است.

اگزوتوکسین A یک پروتئین سیتوتوکسیک قوی است که توسط باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا ترشح می گردد و جزء توکسین های ADP-ribosylating میباشد. قابلیت اگزوتوکسین A در ایجاد تغییرات کوالانت در elongation factor سلولهای یوکاریوتی از طریق ADP-ribosylation هیستیدین مورد مطالعات فراوان قرار گرفته است.

هدف از مطالعه حاضر استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک به منظور طراحی و ساخت واکسنی نوترکیب در برابر عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا می باشد تا بدین وسیله محافظت بهتر و بلند مدتی در مقابل باکتری مذکور ایجاد گردد.

بدین منظور قسمت ایمنی‌زای (دومین انتقال دهنده بعلاوه دومین 1b) اگزوتوکسین A از سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO_1 تحت کنترل پروموتور T7 و با استفاده از وکتور pET28a در ای کولای DH5a کلون گشت. بررسی بیان پروتئین نوترکیب در ای کولای BL21 صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب به عنوان DNA واکسن در موش بکار برده شد. پس از ایجاد سوختگی درجه سه در موش‌ها و در نتیجه تضعیف سیستم ایمنی، نشان داده شد که واکسیناسیون منجر افزایش پاسخ‌های ایمنی همورال و مخاطی شده و علاوه بر افزایش درصد بقاء، منجر به کاهش بار میکروبی در موش‌های واکسینه شده گشت.

در نتیجه نشان داده شد که استفاده از این DNA واکسن منجر به ایجاد محافظت مناسبی بر علیه سودوموناس آئروژینوزا گشت.

فصل دوم:

کلیات

۱-۲- جنس سودوموناس:

گونه‌های سودوموناس باسیل‌های گرم منفی، هوازی و متحرک هستند و برخی از آن‌ها رنگدانه‌های محلول در آب تولید می کنند. سودوموناس‌ها به طور وسیعی در خاک، آب، گیاهان و حیوانات وجود دارند و بر اساس شباهت rRNA و خصوصیات رایج کشت، طبقه‌بندی می شوند. سودوموناس‌هایی که از نظر طبی اهمیت دارند در جدول ۲- ۱ آورده شده اند.

جدول ۲- ۱ طبقه بندی بعضی از سودوموناس هایی که از نظر طبی اهمیت دارند. (بروکس، ۲۰۰۷)

شبیه بودن rRNA گروه و زیر گروه	جنس و گونه
I. گروه فلوئورسنتی	سودوموناس آئروژینوزا(*P.aeruginosa*)
	سودوموناس فلوئورسنس(*P.fluorescens*)
	سودوموناس پوتیدا (*P.putida*)
گروه غیر فلوئورسنتی	سودوموناس استوتزری(*P.stutzeri*)
	سودوموناس مندوسینا (*P.mendocina*)
II.	بورخولدر یا پسودومالئی (*Burkholderia pseudomallei*)
	بورخولدریا مالئی (*Burkholderia mallei*)
	بورخولدریا سپاسیا (*Burkholderia cepacia*)
	رالستونیا پیکتی (*Ralstonia pickettii*)
III.	گونه‌های کومامونا‌س (*Comamonas species*)
	گونه‌های اسیدووراکس (*Acidovorax species*)
IV.	گونه‌های بروندیمونا‌س (*Brevundimonas species*)
V.	استنوترومونا‌س مالتوفیلیا (*Stenotrophomonas maltophilia*)

۲-۲- سودوموناس آئروژینوزا:

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی و میله ای متعلق به خانواده *Pseudomonadaceae* می باشد. این باکتری آزادزی بوده و معمولا در آب و خاک یافت می شود.

فرصت‌طلب بودن سودوموناس آئروژینوزا بدین معنی می باشد که این جرم از برخی نواقص دفاع میزبان برای آغاز عفونت‌زائی استفاده می نماید. اندازه این باکتری میله‌ای ۱/۵ تا ۳ در ۰/۵ تا ۰/۸ میکرومتر است و از طریق یک تاژک قطبی حرکت می نماید. متابولیسم تولید انرژی از طریق تنفس است ولی در صورت غیاب O_2 و در حضور NO_3 هم می تواند به تولید انرژی بپردازد. سودوموناس آئروژینوزا نیازهای غذایی ساده ای دارد و حتی می تواند در آب مقطر هم رشد کند. در آزمایشگاه ساده‌ترین محیط برای رشد شامل استات به عنوان منبع کربن و آمونیوم سولفات به عنوان منبع نیتروژن می باشد. بهترین درجه-حرارت برای رشد آن ۳۷°C بوده ولی می‌تواند تا درجه حرارت۴۲°C هم رشد نماید. سودوموناس آئروژینوزا قادر به تحمل شرایط فیزیکی متعددی می‌باشد و در مقابل غلظت‌های بالایی از نمک، رنگ، آنتی‌سپتیک‌های ضعیف و بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است. جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا می توانند سه تیپ کلونی تولید کنند. باکتری‌هایی که از خاک یا آب جدا می شوند، اغلب کلونی‌های کوچک و خشن تولید می کنند. نمونه‌های بالینی کلونی‌های صاف ایجاد می نمایند که به دو صورت دیده می شوند. یک نوع به صورت کلونی‌هایی با ظاهر تخم مرغ سرخ شده، بزرگ با کناره‌های صاف می باشد. نوع دیگر که اغلب از نمونه‌های تنفسی و ترشحات دستگاه ادراری بدست می آید، دارای ظاهر موکوئید بوده که به دلیل ترشح لایه Alginate می‌باشد. کلونی‌های صاف و موکوئید به نظر می رسد که در کلونیزاسیون و حدت باکتری نقش داشته باشند (Todar , 2009).

رنگدانه: سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا رنگدانه‌های انتشاری مختلفی را تولید می کنند.

این رنگدانه ها عبارتند از:

- پیوسیانین(رنگدانه آبی): این رنگدانه در سودوموناس آئروژینوزا منحصر به فرد است و وجه تشخیص می باشد. بعضی سویه‌ها این رنگدانه را تولید نمی کنند و در تشخیص ایجاد اشکال مینمایند. محیط سودوموناس آگار قدرت تولید پیوسیانین را افزایش می دهد. پیوسیانین در آب و کلروفرم قابل حل است. این رنگدانه در اثر اکسیده شدن به قهوه ای تغییر رنگ می دهد.
- پیووردین(رنگدانه زرد): پیووردین را به دلیل ایجاد فلورسانس در نور ماوراء بنفش رنگدانه فلورسئین می نامند. این رنگدانه در آب محلول است.
- پیوروبین(رنگدانه قرمز): تولید این رنگدانه توسط باکتری کمتر معمول می باشد. تولید آن کند است و بهترین شرایط تولید آن کشت باکتری در محیط آگار مغذی شیب دار در درجه حرارت اتاق و به مدت دو هفته می باشد.

- پیوملانین(رنگدانه سیاه): از نظر تولید مشابه پیوروبین می باشد (طباطبائی، ۱۳۷۹).

۳-۲- پاتوژنز:

پاتوژنز عفونتهای سودوموناسی چند عاملی و پیچیده است. سویه‌های سودوموناس اغلب مهاجم و توکسین‌زا هستند. عفونت‌زایی آن‌ها در سه مرحله صورت می گیرد.

۱- چسبیدن و کلونیزاسیون باکتری

۲- عفونت موضعی

۳- انتشار در خون و ایجاد بیماری سیستمیک (Qarah, 2009).

کلونیزاسیون: به دلیل اینکه سودوموناس آئروژینوزا به طور پراکنده در طبیعت حضور دارد، منبع دقیق و راه انتقال پاتوژن اغلب نامشخص است. این باکتری گاهی به صورت فلور نرمال بدن انسان است. فیمبریه باکتری عامل اتصال آن به سلول‌های اپیتلیال در قسمت فوقانی دستگاه تنفس می باشد این اتصال از طریق رسپتورهای سیالیک اسید، گالاکتوز یا مانور در سطح سلول‌های اپیتلیال صورت می گیرد. بعلاوه ترشح آنزیم پروتئاز هم باعث تجزیه فیبرونکتین شده و در نتیجه باعث تماس رسپتورهای فیبریه ای با سطح سلول‌های اپیتلیال می شود. جراحت بافتی هم میتواند، نقش مهمی در کلونیزاسیون باکتری در سیستم تنفسی ایفا نماید. سودوموناس آئروژینوزا می تواند به سلول‌های اپتیلیال نایی در موش مبتلا به عفونت با ویروس آنفلوآنزا متصل شود ولی قادر به اتصال به سلول‌های اپیتلیال نرمال نیست. به این نوع کلونیزاسیون، اتصال فرصت طلب گفته می شود و نقش مهمی در کراتیت سودوموناسی و عفونت های سیستم ادراری و تنفسی دارد.

در سطح سلول‌های اپیتلیال نایی رسپتورهایی برای پیلی‌های سودوموناس وجود دارد که از جنس سیالیک اسید میباشد(N-actylneuraminic-acid) .

سویه‌های موکوئید تولید نوعی اگزوپلی‌ساکارید (Alginate) مینماید که باعث انتقال باکتری به موسین برونشی نایی میباشد(N-acetylglucosamine). علاوه بر پیلی و پلی‌ساکاریدهای موکوئید، یکسری عوامل دیگری هم در اتصال و کلونیزاسیون سودوموناس نقش دارند.

اگزوآنزیم S باکتری می تواند به گلیکولیپیدهای موجود در سطح سلول‌های اپیتلیال تنفسی متصل شود.

تهاجم: توانایی سودوموناس آئروژینوزا در تهاجم به بافت‌ها وابسته به تولید آنزیم‌های خارج سلولی و توکسین‌ها می باشد. این عوامل باعث آسیب به موانع فیزیکی در سلول‌های میزبان می باشند. بعلاوه کپسول و لایه‌های مترشحه توسط باکتری، از آن در مقابل اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز محافظت می نمایند. دو نوع پروتئاز خارج سلولی در مرحله تهاجم بافتی نقش دارند. الاستاز و آلکالاین پروتئاز. الاستاز باعث تجزیه کلاژن، IgG و IgA و کمپلمان می شود و با تجزیه فیبرونکتین منجر به در دسترس قرار گرفتن

رسپتورهای موجود در سطوح مخاطی می شود. الاستاز همچنین باعث تخریب اپیتلیال تنفسی شده و در فعالیت مژک‌های تنفسی اختلال ایجاد می کند. آلکالاین پروتئاز از تشکیل فیبرین جلوگیری کرده و باعث لیز فیبرین می گردد. این دو آنزیم همچنین باعث غیرفعال شدن Gamma interferon و Tumor necrosis factor می شوند.

سودوموناس آئروژینوزا همچنین سه نوع پروتئین محلول تولید می کند که در تهاجم باکتری نقش دارند. یک سیتوتوکسین(MW, 25kDa) و دو نوع همولیزین. به این سیتوتوکسین، لوکوسیدین گفته می شود چون بر روی نوتروفیل‌ها اثر دارد ولی به نظر می رسد که بر روی اغلب سلول‌های یوکاریوتی تاثیر می گذارد. فسفولیپاز و لکتیناز، دو نوع همولیزین مترشحه توسط باکتری هستند و همراه هم منجر به تخریب لیپیدها و لکتین هستند. سیتوتوکسین و همولیزین‌ها از طریق فعالیت سیتوتوکسیک بر روی نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های یوکاریوتی، در فعالیت تهاجمی باکتری نقش دارند.

رنگدانه‌های پیوسیانین باکتری هم در تهاجم باکتری موثر است. این رنگدانه باعث تخریب اپیتلیوم تنفسی می شود. یک مشتق از این رنگدانه، Pyochelin نام دارد که نوعی سیدروفور می باشد. این سیدروفور آهن میزبان را گرفته و آن را برای رشد به باکتری می دهد.

انتشار: اگر چه کاملا مشخص نشده که سودوموناس آئروژینوزا چگونه بیماری سیستمیک ایجاد می کند ولی این باکتری در مقابل فاگوستیوز و فعالیت‌های باکتریسیدال سرم مقاوم می باشد. پروتئازهای باکتری کمپلمان را غیر فعال کرده، باعث تخریب آنتی بادی‌های IgG در سرم می شوند و همین طور منجر به غیر فعال شدن IFN و TNF و سایر سایتوکین‌ها می گردند. لیپید A از LPS باکتری باعث ایجاد تب، هیپوتانسیون و انعقاد داخل عروقی می شود. بعلاوه اگزوتوکسین A باکتری هم در مرحله انتشار خونی باکتری، موثر می باشد.

خلاصه ای از عوامل حدت در سودوموناس آئروژینوزا به شرح زیر می باشد(Todar, 2009).

چسبندگی:

- فیبریه (N-methyl-phenylalanine-pili)
- کپسول پلی ساکاریدی (glycocalyx)
- لایه آلجینات (biofilm)

تهاجم:

- الاستاز
- آلکالاین پروتئاز
- همولیزین‌ها (فسفولیپاز و لکتیناز)
- سیتوتوکسین (لکوسیدین)

- سیدروفورها
- رنگدانه پیوسیانین

تحرک و کموتاکسی:

- فلاژل

توکسین‌ها:

- اگزوآنزیم S
- اگزوتوکسین A
- لیپو پلی‌ساکارید

خصوصیات آنتی‌فاگوسیتیک:

- کپسول، لایه لعابی
- LPS
- تشکیل بیوفیلم

مقاومت در برابر فعالیت باکتریسیدال سرم:

- کپسول، لایه لعابی، بیو فیلم
- آنزیم‌های پروتئاز

خصوصیات خاص ژنتیکی:

- تغییرات ژنتیکی از طریق ترانسدوکسین
- مقاومت ذاتی در برابر داروها
- فاکتورهای R و پلاسمیدهای عامل مقاومت دارویی

خصوصیات خاص اکولوژیکی:

- تغییرات ژنتیکی از طریق ترانسدوکسین
- مقاومت ذاتی در برابر داروها
- فاکتورهای R و پلاسمیدهای عامل مقاومت دارویی

خصوصیات خاص اکولوژیکی:

- سازگاری با حداقل شرایط غذایی

- تنوع متابولیکی
- حضور در مکانهای متنوع

٤-٢- بیماری‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا:

٤-٢-١- دستگاه تنفس:

پنومونی سودوموناسی در افرادی که دچار تضعیف سیستم ایمنی هستند و عفونت ریوی مزمن دارند، دیده می شود. این عفونت به صورت بیمارستانی در ICU می تواند ایجاد شود و حتی از طریق لوله‌های نایی هم کسب می گردد. پنومونی سودوموناسی می تواند به صورت اولیه در اثر آسپیره‌کردن ارگانیسم از قسمت‌های فوقانی دستگاه تنفس به ویژه در افرادی که از تنفس‌مصنوعی استفاده میکنند، ایجاد شود. بعلاوه این نوع پنومونی می‌تواند از طریق انتشار خونی باکتری به ریه‌ها هم ایجاد شود. این حالت بیشتر در افراد مبتلا به نوتروپنی به دنبال شیمی‌درمانی و در مبتلایان به ایدز بیشتر دیده می شود. عفونت مزمن قسمت تحتانی دستگاه تنفس با سودوموناس آئروژینوزا در میان مبتلایان به فیبروز سیستمیک زیاد است. این بیماران دچار سرفه‌های مزمن، آنورکسی و کاهش وزن می شوند. علایم پنومونی سودوموناسی در کل شامل تب و لرز، دیس پنه شدید، سیانوز، سرفه و علایم التهابی می باشد.

٤-٢-٢- باکتریمی:

باکتریمی سودوموناسی می تواند در اثر استفاده از وسایل پزشکی در بیمارستان‌ها کسب شود و میزان مرگ و میر ناشی از آن ۱۰٪ است. علایم و نشانه‌ها وابسته به محل اولیه عفونت است.

٤-٢-٣- آندوکاردیت:

سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند دریچه‌های قلبی را در افرادی که از داروهای تزریقی به صورت داخل عروقی سوءاستفاده می کنند، درگیر سازد. دریچه‌های طرف راست و چپ می توانند درگیر شوند. علایم غیراختصاصی شامل تب دیده می شود و بسته به اینکه کدام دریچه قلبی درگیر شده، یکسری علایم اختصاصی‌تر هم دیده می شود. آندو کاردیت طرف چپ ایجاد نارسائی احتقانی قلب می نماید.

٤-٢-٤- سیستم عصبی مرکزی:

عفونت سودوموناسی می‌تواند ایجاد مننژیت و آبسه‌های مغزی نماید. در اغلب موارد عفونت از طریق گوش، ماستوئید و سینوس‌های پارانازال به سیستم عصبی مرکزی راه می یابد. در برخی بیماران درگیری CNS به دلیل انتشار خونی ارگانیسم به دنبال آندوکاردیت، پنومونی یا عفونت دستگاه ادراری می باشد. نشانه‌های عفونت سودوموناسی سیستم عصبی مرکزی شامل تب، سردرد و گیجی است.

۵-٤-۲- گوش:

در اوتیت خارجی(swimmer's ear) بیماران دارای نشانه‌های درد و ترشحات گوشی‌اند. سودوموناس یکی از علل شایع ایجاد عفونت در گوش میانی هم می باشد. در مبتلایان به دیابت کنترل نشده، اوتیت خارجی سودوموناسی شایع است و اغلب به درمان های آنتی‌بیوتیکی هم پاسخی نمی دهد.
علایم اوتیت سودوموناسی شامل درد دایم، کشش در بافت‌های نرم گوش و ادم است. تب اغلب شایع نیست. گسترش عفونت می تواند به استئومیلیت منتهی شود و در نهایت در CNS ایجاد عفونت نماید.

٦-٤-۲- چشم:

سودوموناس آئروژینوزا یک عامل اصلی در ایجاد کراتیت باکتریایی است. درگیری قرنیه به دلیل تروما، استفاده از لنزهای چشمی و در مبتلایان به AIDS دیده می شود. جراحات قرنیه می‌تواند به آندوفتالمیت و معلولیت چشمی منجر گردد. نشانه‌ها شامل درد، التهاب و تضعیف بینایی است.

۷ -٤-۲- استخوان ها ومفاصل:

مهمترین محل درگیر، ستون مهره‌ها می باشد. عفونت در افرادی که از داروهای تزریقی سوءاستفاده می کنند، از راه خون به استخوان می رسد. همین طور در افرادی که دچار جراحاتی در پای خود هستند و یا مبتلا به دیابت ملیتوس می باشند هم عفونت استخوان ها و مفاصل با سودوموناس دیده می شود.
استئومیلیت ستون مهره‌ها باعث ایجاد درد در قسمت پشت وگردن می گردد که هفته‌ها تا ماه‌ها به طول می کشد. گزارش شده که در مبتلایان به UTI هم ممکن است استئو میلیت لومبوساکرال ایجاد شود.

۸-٤-۲- دستگاه گوارش:

عفونت‌های سودوموناسی می‌تواند هر قسمتی از دستگاه‌گوارش را مبتلا سازد و اغلب بچه‌های با سن کم و بالغین مبتلا به بدخیمی‌های خونی و افرادیکه در اثر کموتراپی مبتلا به نوتروپنی هستند را درگیر می سازد. بعلاوه کلونیزاسیون باکتری در GI یک راه مهم ورود باکتری به داخل خون می باشد. طیف درگیری می تواند از ایجاد علایم ملایم تا آنتروکولیت نکروز دهنده باشد. علایم اغلب در قالب استفراغ، اسهال و دهیدراتاسیون است.

۹-٤-۲- عفونت دستگاه ادراری:

عفونت دستگاه ادراری (UTI) به واسطه سودوموناس اغلب در بیمارستان کسب می شود و در اثر سوند گذاری و جراحی ایجاد می شود. عفونت دستگاه ادراری می تواند بالا رونده و یا پایین رونده(به واسطه انتشار از طریق خون) باشد. هیچ گونه علایم خاصی عفونت‌های ادراری ناشی از سودوموناس را از دیگر عفونت‌های دستگاه ادراری متمایز نمی سازد.

۱۰-٤-۲- پوست:

سودوموناس روی پوست خشک رشد نمی کند، ولی بر روی پوست مرطوب به خوبی رشد دارد. سندرم ناخن سبز معمولا در افرادی دیده می شود که دست هایشان اغلب در تماس با آب است.
سودوموناس قادر به ایجاد عفونت‌های ثانویه در مبتلایان به اگزما می باشد و همین طور فولیکولیت ناشی از این ارگانیسم شایع می باشد. سودوموناس به عنوان مهمترین منبع ایجاد سپتی سمی پس از سوختگی مطرح است و در این شرایط ۱۰۰۰۰۰ باکتری در هر گرم بافت قابل مشاهده می باشد (Qarah, 2009).

۵- ۲- عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در حیوانات:

همه حیوانات: عفونت‌های زخم، تشکیل آبسه، اسهال، عفونت‌های گوش، دستگاه ادراری تناسلی و عفونت‌های بیمارستانی.

- اسب: سقط، عفونت‌های قرنیه و جیب حلقی
- گاو: تورم پستان، سقط و عفونت‌های دستگاه تناسلی
- سگ و گربه: التهاب پروستات، مثانه و پوست، سپتی‌سمی پس از جراحی، عفونت گوش و التهاب اندوکارد
- طیور: سپتی‌سمی و عفونت‌های دستگاه تنفس
- مینک: پنومونی هموراژیک
- گوسفند: پشم سبز و التهاب پوست (کارتر، ۲۰۰۹).

گونه‌های بیماری‌زای سودوموناس و بیماری‌های ناشی ازآن‌ها در جدول۲- ۲ خلاصه شده است.

جدول ۲-۲: گونه‌های بیماری‌زای سودوموناس و بیماریهای ناشی از آن‌ها: (طباطبایی، ۱۳۸۰)

گونه‌های سودوموناس	میزبان	بیماری
سودوموناس آئروژینوزا	گاو	تورم پستان، عفونت رحمی، عفونت جلدی، آبسه‌ها، تورم روده و آرتریت
	گوسفند و بز	تورم پستان، پنومونی، آبسه‌های ریوی و پشم سبز
	اسب، سگ و گربه	تورم رحم، آبسه‌های ریوی و عفونت چشمی، گوش درد خارجی، تورم مثانه، آندوکاردیت، تورم جلد، عفونت‌های زخم و تورم ملتحمه
	گونه‌های مختلف دامی	عفونت سوختگی‌ها و سایر زخم‌ها، اسهال، عفونت‌های تناسلی و بیمارستانی.
سودوموناس سودومالئی	گونه‌های مختلف دامی	میلوئیدوز(شبه مشمشه)
	اسب	بیماری مشابه مشمشه
	گاو	شکل‌های حاد و مزمن ضایعات موضعی
	گوسفند	در ریه‌ها، مفاصل و رحم، آرتریت، تورم عروق لنفاوی
	بز	کاهش وزن، اختلالات دستگاه اعصاب‌مرکزی و تنفسی، آرتریت و تورم پستان
سودوموناس مالئی	اسب، انسان وگربه	مشمشه، اسهال حاد، اشکال مزمن شامل شکل ریوی و جلدی،

٦-٢- اگزوتوکسین A:

در طی قرن نوزدهم Charrin و Bouchard متوجه شدند که نوعی از توکسین در بیماری‌زایی سودوموناس در انسان اهمیت دارد. (Barker, 1897) بعدها این توکسین توسط liu مورد شناسایی قرار گرفت. (liu, 1971) او مشخص کرد که سودوموناس طی شرایط خاصی از رشد، نوعی پروتئین خارج سلولی ترشح می کند که برای موش کشنده بوده و موجب نکروز پوست خرگوش می گردد.
(liu et al, 1973)

در نهایت liu توانست این توکسین را خالص سازی نماید و اسم آن را اگزوتوکسین A گذاشت.
(Liu et al, 1973)

باکتری فرصت‌طلب سودوموناس آئروژینوزا فاکتورهای حدت مختلفی را ترشح می نماید که از میان آن-ها اگزوتوکسین A(66.583 KDa) از همه سمی‌تر است (Douglas et al, 1987). این توکسین از سه دومین اصلی و یک دومین فرعی تشکیل شده است. دومین‌های اصلی شامل I,II,III و دومین فرعی شامل 1b می‌باشد(Allured et al, 1986). دومین I، دومین متصل شونده به سلول است. دومین II، دومین انتقال‌دهنده می‌باشد که اجازه ورود توکسین به داخل سیتوزول را می دهد. دومین III، ADP-ribosylatiny می باشد که با غیر فعال سازیelongation factor II منجر به مرگ سلولی می شود (Pastan, 2003). ترشح موثر توکسین نقش مهمی در قابلیت میکروارگانیسم پاتوژن در ایجاد بیماری دارد، زیرا اگزوتوکسین A باکتری می‌تواند در مکانی دورتر از محل کلونیزاسیون باکتری اثر بگذارد. این پروتئین پس از ساخته‌شدن، از طریق محل اتصال غشاهای داخلی و خارجی(bayer junction) به بیرون ترشح می شود. همچنین سودوموناس آئروژینوزا دارای یکسری پروتئین‌ها در غشا سیتوپلاسمی، فضای پری پلاسمی و غشا خارجی می باشد تا ترشح اگزوتوکسین A را تسهیل نماید
(Lory and Storm , 1988). اگزوتوکسین A یک پلی پپتید تک رشته ای و حساس به تریپسین می باشد (Callahan, 1974). نقطه ایزوالکتریک این پروتئین 5.1 بوده و نسبت بالایی از آرژنین به لیزین را دارا می باشد. همچنین دارای چهار پیوند دی‌سولفیدی در ساختمان خود است (leppla, 1976).
اگزوتوکسین A توسط ۸۸٪ از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا ترشح می شود (Pollack, 1977).

١-٦-٢- سمیت:

اگزوتوکسین A خالص در مقدار ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم برای موش کشنده است و سمیت آن ۱۰۰۰ بار بیشتر از لیپوپلی‌ساکارید باکتری می باشد (Callahan, 1976). اگزوتوکسین A همچنین برای رت، خرگوش، سگ و میمون‌ها هم کشنده می باشد (Pavlovskis et al, 1975) .
ولی علایم کلینیکی توکسین در این گونه‌ها متفاوت می باشد. سگ‌ها و میمون‌هایی که اگزوتوکسین A سودوموناس را به صورت تزریق داخل رگی دریافت کرده اند، دچار کاهش برون ده قلبی و کاهش فشار

خون سرخرگی می‌شوند و به دنبال نقص تنفسی و اسیدوز متابولیک می میرند. مهمترین یافته پاتولوژیک در آن‌ها نکروز هپاتوسلولار است (Pavlovskis et al, 1976) .

در موش‌ها کاهش فیبرینوژن به همراه ترومبوسیتوپنی و افزایش فیبرین گردشی دیده می شود و بعد از مرگ هموراژی‌هایی در سطوح سروزی موش‌ها قابل مشاهده است (Genell et al, 1973).

در خرگوش این توکسین ایجاد نکروز پوستی می نماید و وقتی داخل قرنیه تزریق گردد باعث نکروز اپی تلیال، آندوتلیال و سلولهای استرومال می گردد (Iglewski et al, 1977).

۲-٦-۲- ارتباط بین ساختار و فعالیت توکسین:

اگزوتوکسین A یک پروآنزیمی است که از یک قسمت NH_2-terminal(قسمت A) و یک قسمت COOH- terminal (قسمتB) تشکیل شده است (Leppla et al, 1978). در مقایسه با توکسین دیفتری که باید اول به صورت پروتئولیتیک شکافته شود تا فعالیت آنزیمی خود را بروز دهد، توکسین دست نخورده سودوموناس برخی فعالیت‌های آنزیمی را نشان می دهد و وقتی در معرض اوره ۸ مولار و دی تیوتریتول ۱% قرار بگیرد فعالیت آن افزایش می یابد. به این دلیل که تغییراتی در ساختار چهارم پروتئین ایجاد می گردد به طوریکه قسمت‌های آنزیماتیک توکسین را در معرض قرار می دهد(Pollack, 1983) بعلاوه اگر از کشت های تولید کننده توکسین در انتهای فاز رکود، توکسین را استخراج کنیم و در معرض ذوب و انجماد قرار دهیم یا در $-۲۰^{\circ}c$ ذخیره کنیم و یا توکسین را در معرض کیموتریپسین قرار دهیم، فعال‌سازی آنزیمی صورت می گیرد (Lory and Collier, 1980). در تمامی این روش‌ها یک پپتید ۲٦۰۰۰ دالتونی غیر سمی و فعال از نظر آنزیمی بدست می آید(قسمت A) که قابل تمایز از کل توکسین می باشد (Vasil and kabat, 1977). قسمت A توکسین در صورتی می تواند فعالیت آنزیماتیک خود را نشان بدهدکه توسط قسمت B به سیتوپلاسم سلول‌های هدف دسترسی پیدا کند (Pollack et al, 1982).

۳-٦-۲- نقش اگزوتوکسین A در عفونت زایی:

اگزوتوکسین A سودوموناس، یکی از معدود توکسین‌های باکتریایی است که مکانیسم عملش در سطح مولکولی مشخص شده است. بر اساس آزمایشاتی که بر روی حیوانات مدل انجام شده است بیماری زایی این توکسین از طریق توقف سنتز پروتئین صورت می گیرد(Pollack, 1983). در موش‌های سوخته شده‌ای که توسط سویه‌های توکسین‌زای سودوموناس عفونی شده اند هم دیده شده که در سرم و همین طور در محل‌های سوختگی، توکسین یافت می شود. تجویز آنتی‌بادی‌های ضد اگزوتوکسین A به موش‌ها قبل از القای عفونت، می‌تواند جلوی فعالیت توکسین را بگیرد و باعث کاهش تهاجم بافتی و باکتریایی شده و بقاء موش‌ها را افزایش می‌دهد (Snell et al, 1978). نقش پاتوژنیکی اگزوتوکسین A توسط ایجاد عفونت قرنیه در موشها مورد مطالعه قرار گرفته است و دیده شد که سویه‌های توکسین زای باکتری حدت بیشتری از خود نشان می دهند و آسیب بافتی بالاتری را نسبت به سویه‌های غیرتوکسین

زای باکتری ایجاد می نمایند (Ohman and Iglewski, 1980). شواهد بیشتر برای اثبات نقش پاتوژنیکی اگزوتوکسین A، حضور آنتی‌بادی های سرمی ضد اگزو توکسین A در مبتلایان به عفونت های سودوموناسی است (Pollack and Young, 1979). در غیاب این آنتی‌بادی ها، مرگ به دنبال سپتی‌سمی ناشی از عفونت سودوموناسی اتفاق می افتد. چون سودوموناس خاصیت تهاجمی دارد، بافت-های مختلف میزبان در معرض لیپوپلی ساکارید و فرآورده‌های خارج سلولی آن مثل اگزوتوکسین A، قرار می گیرند. چون اگزوتوکسین A دارای خواص متوقف‌سازی سنتز پروتئین می باشد، می‌تواند در ساخت ایمونوتوکسین‌ها استفاده گردد. این توکسین برای ماکروفاژهای انسانی سیتوتوکسیک است (Pollack and Anderson, 1978) و از پاسخ دهی سلولهای طحال موش هم ممانعت به عمل می آورد (Hale and Lewis,1979). همچنین از فعالیت سلولهای تک هسته ای انسانی جلوگیری کرده و جلوی فعالیت پروجنیتورهای گرانولوسیت - ماکروفاژ را در مغز استخوان انسان می گیرد (Stuart and Pollack, 1982).

۷-۲- مقاومت‌های آنتی بیوتیکی:

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب شایع می باشد. یکی از خصوصیات مهم این باکتری حساسیت پایین آن نسبت به آنتی بیوتیک‌ها است. این حساسیت پایین به دلیل حضور پمپ‌های افلاکس بوده که توسط ژن‌های کروموزومی *mexXY* , *mexAB* تولید می شوند. همین طور پوشش خارجی باکتری قابلیت نفوذپذیری پایین دارد. علاوه بر این‌ها، پاتوژن مذکور مقاومت‌های اکتسابی را توسط موتاسیون در ژن‌های کروموزومی و یا انتقال افقی ژن‌های مرتبط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کسب می‌نماید. ایجاد سویه هایی که نسبت به چندین دارو مقاوم هستند نیازمند چندین جهش و یا انتقال افقی ژن‌های مربوطه به مقاومت دارویی است (Poole, 2004).

۸-۲- تشخیص:

الف) نمونه‌ها

با توجه به نوع عفونت، نمونه را باید از ضایعات پوستی، چرک، ادرار، خون، مایع نخایی، خلط و مواد دیگر تهیه نمود.

ب)گستره‌ها:

در گستره‌ها، اغلب باسیل‌های گرم منفی دیده می شود. خصوصیات ظاهری اختصاصی که با آن بتوان سودوموناس‌ها را از سایر باسیل‌های گرم منفی افتراق داد، وجود ندارد.

پ)کشت: