

## ارتباط وجود ژن اگزوتوکسین A (*exo-A*) سودوموناس آئروژینوزا و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن با تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی

دکتر عباسعلی ایمانی فولادی<sup>۱</sup>، مریم حسین زاده<sup>۲</sup>، دکتر سید فضل الله موسوی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار مرکز تحقیقات فرآورده های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> نویسنده مسئول: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاداسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران  
Email: hoseinzadeh\_maryam@rocketmail.com  
<sup>۳</sup> استادیار بخش میکروبیشناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی، هوازی می باشد. اگزوتوکسین A سم اصلی تولید شده توسط این باکتری و یکی از عوامل مرگ و میر می باشد. در حدود ۹۰٪ سویه های سودوموناس آئروژینوزا اگزوتوکسین A تولید می کنند. بیوفیلم ناشی از تجمع میکروارگانیسم ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای مابین آن هاست که به یک سطح متصل شده اند. این باکتری در حالت پلانکتونیک غیرسمی و در فرم بیوفیلم سمیت بالاتری دارد. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین حضور ژن *exo-A* و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی با تشکیل بیوفیلم در سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های بالینی انجام شد.

**روش کار:** در این مطالعه از ۱۱۰ سویه سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت های مختلف با الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص انجام شد. از روش PCR جهت ردیابی وجود یا عدم وجود ژن اگزوتوکسین A (*exo-A*) استفاده شد. میزان تشکیل بیوفیلم به روش اسپکتروفتومتری بررسی گردید. ارتباط وجود ژن *exo-A* و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن با تشکیل بیوفیلم با استفاده از آزمون های آماری فیشر و کای دو بررسی گردید.

**یافته ها:** نودوسه مورد (۸۴/۵٪) از سویه ها دارای ژن *exo-A* بودند ۶۲ سویه دارای مقاومت چندگانه و تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز با طیف اثر وسیع بودند. آنالیز آماری نشان داد که قدرت تشکیل بیوفیلم در سویه های دارای ژن *exo-A* در مقایسه با سویه های فاقد ژن از افزایش معنی داری برخوردار بود ( $p < 0/05$ ). مشخص گردید که توانایی درصد تشکیل بیوفیلم در سویه های مقاوم به چند دارو و تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز در مقایسه با سویه های حساس بیشتر است ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** این مطالعه بیانگر این است که از لحاظ آماری بین وجود ژن *exo-A* و مقاومت های آنتی بیوتیکی در تشکیل بیوفیلم توسط سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد. با توجه به اهمیت بیوفیلم در پروسه بیماریزایی این باکتری این مطالعه زمینه جدیدی را برای مطالعه فرایندهای مولکولی دخیل در تشکیل بیوفیلم باز می نماید.

**کلمات کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا؛ ژن اگزوتوکسین A؛ الگوی مقاومت دارویی؛ بیوفیلم

دریافت: ۸۹/۶/۱۱ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۰

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Imani Foolad AA, Hosainzadeh M, Mousavi SF. Association between Exotoxin A (*exo-A*) Gene and Antibiotic Resistance Pattern with Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(1): 7-13. (Full text in Persian)

## مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری پاتوژن فرصت طلب گرم منفی و هوازی است که دارای لیپوپلی ساکارید، تاژک قطبی و پیلی می باشد. این عوامل سبب ایجاد حرکت و چسبیدن باکتری به غشای سلولی می شوند و در بیماران بستری و دارای نقص ایمنی، به عنوان عامل بیماری زایی این باکتری، نقش مهمی را ایفا می کنند [۱].

اگزوتوکسین A سم اصلی تولید شده توسط این باکتری یکی از عوامل مرگ و میر می باشد. این سم به صورت کروموزمی کد می شود و از ژن آن فقط یک نسخه وجود دارد که در ۹۰٪ از سویه های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد، ولی exo-A در یک سویه همیشه تولید نمی شود. این ماده با غیرفعال ساختن فاکتور ۲ طول سازی پروتئین<sup>۱</sup> باعث توقف سنتز پروتئین و کشته شدن سلول ها می گردد. اگزوتوکسین A دارای سه ناحیه است: ناحیه I به رستپورهای سلول میزبان متصل شده و اندوسیتوز را آغاز می کند. با اسیدی شدن اندوزوم، ناحیه II حرکت توکسین به سیتوپلاسم سلول را موجب شده و ناحیه III انتقال ADP ریبوز به EF2 را کاتالیز می کند [۲،۳].

بیوفیلیم حاصل از تجمع میکروارگانیسم ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای مابین آن- هاست که به یک سطح متصل شده اند [۴]. بیوفیلیم ها به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمریک خارج سلولی مانعی در برابر نفوذ عوامل ضدمیکروبی و آنتی بیوتیک ها می گردند [۵]. بیوفیلیم با عوامل کنترلی مانند حرارت، خشک کردن، پاک کننده ها و شوینده ها به سادگی از بین نمی روند و بر روی سطوح به ویژه در بیمارستان ها باقی مانده و موجب آلودگی و انتقال بیماری های ناشی از آن می گردد [۶].

این باکتری در حالت پلانکتونیک غیرسمی و در فرم بیوفیلیم سمیت بالاتری دارد [۷].

وضعیت درمان بیماران با عفونت سودوموناس آئروژینوزا خصوصاً زمانی که این ارگانیزم بطور ذاتی مقاوم به چند رده آنتی بیوتیکی باشد و بتواند مقاومت به تمام داروهای ضدمیکروبی را کسب کند، مسئله ساز است [۸].

برای مثال، توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی خصوصاً مقاومت به آمینو گلیکوزیدهایی که با واسطه پلاسمید عمل می کنند سریعاً باعث انتقال ژن مقاومت به سودوموناس های حساس و سایر باکتری های گرم منفی گردیده و ارگانیزم را نسبت به درمان مقاوم می کند [۸،۹].

اکتساب سریع مقاومت چند دارویی منجر به مرگ و میر بالا در بیماران بستری شده می شود [۹،۱۰]. سویه های سودوموناس آئروژینوزای تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)<sup>۲</sup> بعنوان سویه های مقاوم به چند دارو می باشند [۱۱،۱۲ و ۱۳]. مطالعه حاضر در جهت بررسی ارتباط بین وجود ژن exo-A، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تولید ESBLs در سودوموناس آئروژینوزا با توانایی تشکیل بیوفیلیم انجام شد.

## روش کار

### نمونه گیری

نمونه ها شامل ۱۱۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای غیرتکراری و متناوب بودند که از اسفند ماه ۱۳۸۷ تا اسفند ماه ۱۳۸۸ از بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان بقیه الله تهران جدا شدند. هر کلنی مشکوک دوباره کشت داده شد و خالص گردید.

نمونه ها بر اساس تست های اکسیداز و تخمیر گلوکز، تولید رنگدانه، الگوی رشد در محیط TSI<sup>۳</sup>

<sup>۲</sup> Extended spectrum beta-Lactamases

<sup>۳</sup> Triple Sugar Iron Agar

<sup>۱</sup> Elongation Factor EF<sub>2</sub>

شده و باندهای مربوطه بعد از رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید زیر نور ماورای بنفش مشاهده شد.

### سنجش تشکیل بیوفیلیم

برای تشکیل بیوفیلیم، یک لام را به صورت عمودی در جار مخصوص قرار داده و درب آن را بسته و آن را اتوکلاو کرده، سپس از محیط LB مایع که قبلاً تهیه و اتوکلاو شده به مقدار ۵۰ میلی لیتر در داخل هر یک از جارها ریخته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند در ارلن حاوی محیط کشت تلقیح گردید سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (GFL 3031 USA) با دور rpm ۱۲۰ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در روز بعد سطح لام با ۲ میلی لیتر بافر فسفات استریل شستشو گردید و به داخل یک کووت تمیز ریخته شد و جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، قرائت گردید. جهت کاهش خطای تکنیکی آزمایش برای هر نمونه ۳ بار تکرار گردید [۱۴].

### ارزبایی حساسیت ضد میکروبی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مورد مطالعه در مقابل ۱۱ آنتی بیوتیک مختلف شامل (سفتازیدیم، کوتریموکسازول، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، نورفلوکساسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، جنتامیسین، آمیکاسین، آموکسی سیلین، سفالکسین) و توانایی تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط آنها در مطالعه قبلی خود نویسندگان تعیین شده بود [۱۱]. در این مطالعه سویه های دارای بتالاکتامازهای

(Merck, Germany)، تولید پیوسیانین و بوی خاص مورد شناسایی قرار گرفتند و سویه ها برای استفاده های بعدی در درجه ۷۰- درجه سانتی گراد در محیط LB<sup>۱</sup> مایع (Merck, Germany)، حاوی ۲۰٪ گلیسرول ذخیره شدند.

### ردیابی ژن exo-A

یک جفت پرایمر تشخیصی برای یک قطعه ۱۹۰ نوکلئوتیدی در ژن exo-A طراحی و توسط شرکت سازنده (سیناژن- ایران) سنتز شد. شماره دسترسی این ژن در سایت NCBI، NC\_002516 می باشد که پرایمرهای آن توسط نرم افزار primer 3 طراحی گردید. تخلیص ژنوم به روش جوشاندن صورت گرفت [۱۱].

کمیت ژنوم توسط روش اسپکتروفتومتری (نانودراپ Thermo SCIENTIFIC 1000) سنجیده شد. جداسازی ژن exo-A با استفاده از جفت پرایمرها (تهیه شده از شرکت سیناژن) و دمای جفت شدن ۶۰ درجه سانتی گراد انجام گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR-10X، ۱ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (۱۰ pmol)، ۱/۵ (۲/۵)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ pmol)، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs (۲/۵ mM)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵U) و ۲ میکرولیتر DNA الگو در دستگاه ترموسایکلر صورت گرفت (جدول ۱).

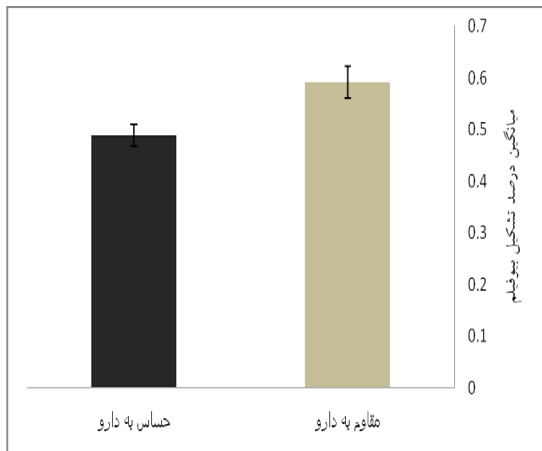
از سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) به عنوان سوش کنترل مثبت استفاده گردید. سپس نمونه ها در کنار مارکر ۱۰۰ bp بر روی ژل ۱/۵٪ آگاروز الکتروفورز

جدول ۱. جفت پرایمرهای پیشرو و معکوس برای ژن exo-A و برنامه حرارتی ترموسایکلر

| اندازه ژن | برنامه حرارتی ترموسایکلر |          |         |                    | توالی پرایمر | پرایمر   |
|-----------|--------------------------|----------|---------|--------------------|--------------|----------|
|           | طویل شدن نهایی           | طویل شدن | اتصال   | داناتوراسیون اولیه |              |          |
| ۱۹۰bp     | ۷۲                       | ۷۲       | ۶۰      | ۹۴                 | ۵' → ۳'      | exo-A- F |
|           | ۵ دقیقه                  | ۱ دقیقه  | ۱ دقیقه | ۳ دقیقه            |              | exo-A- R |

<sup>۱</sup> Laurent Broth

۰/۳ ± ۰/۵۹ و در سویه‌های حساس ۰/۲ ± ۰/۴۸. آنالیز آماری نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های دارای مقاومت چندگانه در مقایسه با سویه‌های حساس بیشتر است و بر اساس آزمون آماری فیشر از اختلاف معنی‌دار برخوردار است ( $p < ۰/۰۵$ ) (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه درصد تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مقاوم به چند دارو (ESBL مثبت) و حساس به دارو (ESBL منفی)

### بحث

گیلپین<sup>۱</sup> و همکاران، تشکیل بیوفیلم و حساسیت آنتی‌میکروبیال سودوموناس آئروژینوزا را در خلط بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس قبل و بعد از مصرف آنتی‌بیوتیک توسط بیماران اندازه‌گیری کردند. آن‌ها پی بردند پیدایش بیوفیلم در مقاوم شدن برخی سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک دخالت دارند [۱۵].

در مطالعه ما نیز توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌هایی که دارای الگوی آنتی‌بیوتیکی چندگانه و تولیدکننده بتالاکتاماز بودند، بالاتر است. گولو<sup>۲</sup> مکانیسم عمل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا و مراحل تشکیل بیوفیلم را به تفصیل بیان نمود و سنتز آلزینات و تنظیم ژن algZ, algR, algB, algC و algD

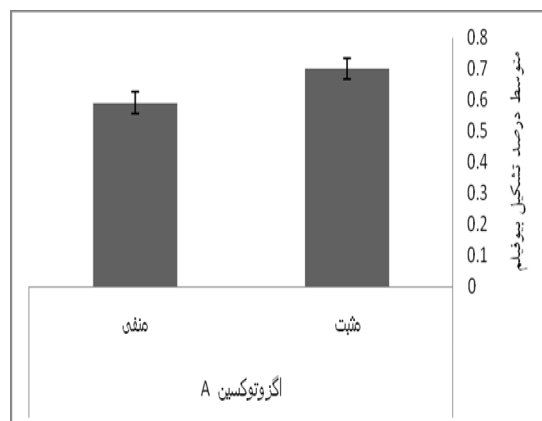
وسیع‌الطیف به عنوان سویه‌های مقاوم به چند دارو در نظر گرفته شد [۱۱، ۱۲ و ۱۳].

### تجزیه و تحلیل آماری

تمامی این اطلاعات توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ آنالیز شدند. ارتباط بین وجود ژن exo-A و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مورد مطالعه توسط آزمون‌های کای دو، فیشر و تی تست بررسی شد.

### یافته‌ها

نودوسه مورد (۸۴/۵٪) از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن exo-A بودند. میانگین جذب نوری در نمونه‌های فوق ۰/۷ ± ۰/۰۳۳ بود که بیشتر از سویه‌های فاقد این ژن (۰/۵ ± ۰/۰۳۵) می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه میانگین درصد تشکیل بیوفیلم در دو حالت اگزوتوکسین A مثبت و منفی

جهت مقایسه قدرت تشکیل بیوفیلم با وجود ژن exo-A، بدلیل کم بودن نمونه‌های فاقد ژن exo-A از آزمون آماری تی تست استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که قدرت تشکیل بیوفیلم در سویه‌های دارای ژن exo-A در مقایسه با سویه‌های فاقد ژن از اختلاف معنی‌داری برخوردار است ( $p < ۰/۰۵$ ).

تعداد ۶۲ سویه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه و تولیدکننده بتا لاکتاماز وسیع‌الطیف بودند. میانگین جذب نوری در نمونه‌های دارای مقاومت چندگانه

<sup>۱</sup> Gilpin

<sup>۲</sup> Golovlev

را که از عوامل مؤثر در تشکیل بیوفیلم‌اند را بررسی کردند [۱۶].

در مطالعه ما وجود ژن *exo-A* در نمونه‌ها و تأثیر آن بر روی قدرت تشکیل بیوفیلم بررسی شد. برخی از مطالعات، از ترکیب دو یا چند آنتی‌بیوتیک به طور همزمان بر علیه کشت‌های بیوفیلم بالغ و پلانکتونیک سودوموناس آئروژینوزا استفاده کردند. نتایج نشان داده است که ترکیب دو آنتی‌بیوتیک کلاریترومایسین و توبرامایسین اثر بیشتری را روی بیوفیلم بیماران سیستمیک فیبروزیس نشان داده است [۱۷].

در این مطالعه، اثر ترکیبی در نظر گرفته نشد، بلکه تأثیر ۱۱ آنتی‌بیوتیک بر روی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای بررسی شد. نتایج ما برای تک تک آنتی‌بیوتیک‌ها به طور جداگانه بررسی شد. باکتری‌های داخل بیوفیلم از طریق انتقال ژن می‌توانند ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیک را کسب کرده و در نتیجه آن مقاومت آنتی‌بیوتیکی را افزایش دهند. مطالعات زیادی در زمینه تأثیر محصول ژن *lasI* یعنی الفاکر آسیل هموسرین لاکتون بر روی بیوفیلم بالغ سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است. قبلاً نشان داده شده است که باکتری‌هایی که دارای نقص در این ژن هستند، ضخامت بیوفیلمی که تولید می‌کنند فقط ۲۰٪ بیوفیلم طبیعی می‌باشد [۱۸]. در تحقیق حاضر، برای اولین بار وجود ژن *exo-A* به عنوان یک فاکتور مؤثر در تشکیل بیوفیلم

سودوموناس آئروژینوزا مطرح شده است که راه را برای تحقیقات بیشتر فراهم می‌کند. با وجود بالا بودن درصد سودوموناس آئروژینوزاهای دارای ژن *exo-A* می‌توان این باکتری‌ها را دارای ویروالانس بیشتر در نظر گرفت و با توجه به بالاتر بودن درصد تشکیل بیوفیلم در این نمونه‌ها می‌توان گفت که احتمال نقش داشتن *exo-A* در تشکیل بیوفیلم وجود دارد. البته در ادامه تحقیق بدنبال جمع آوری تعداد سویه‌های فاقد *exo-A* بیشتری هستیم که کار ساده ای نیست (درصد بالایی از سویه‌ها دارای این ژن هستند) تا در مقیاس وسیعتری ارتباط دو فاکتور فوق بررسی شود. از طرفی وجود ژن نمی‌تواند دلیلی بر تولید محصول آن ژن در باکتری باشد لذا در مطالعاتی باید ارتباط بین وجود ژن و تولید توکسین نیز مورد بررسی قرار گیرد.

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه بیانگر این است که از لحاظ آماری بین وجود ژن *exo-A* و همین طور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در تشکیل بیوفیلم توسط سودوموناس آئروژینوزا ارتباط معنی‌داری وجود دارد. با توجه به اهمیت بیوفیلم در پروسه بیماریزایی این باکتری این مطالعه زمینه جدیدی را برای مطالعه فرآیندهای مولکولی دخیل در تشکیل بیوفیلم را باز می‌نماید.

### References

- 1- Driscoll JA, Brody SL, Kollef, MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007; 67(3): 351-368.
- 2- Armstrong S, Yates SP, Merrill AR. Insight into the catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Studies of toxin interaction with eukaryotic Elongation factor-2*. *J Biol Chem*. 2002 Nov 29; 277(48): 46669-75.
- 3- Finck-Barbançon V, Goranson J, Zhu L, Sawa T, Wiener-Kronish JP, Fleiszig SM, et al. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol*. 1997 Aug; 25(3): 547-57.
- 4- Wagner VE, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008 Dec; 35(3): 124-34.

- 5- Gilardi GL. Characterization of *Pseudomonas* species isolated from clinical specimens. Appl Microbiol. 1971 Mar; 21(3): 414-9.
- 6- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 2005 Jan; 13(1): 20-6.
- 7- Aghaii S, Malekzadeh F. Resistance to bacterial biofilms than disinfectants. 4<sup>th</sup> congress of Microbiology. Shahed University. 2002. No.84366. (Abstract in Persian)
- 8- Maleknezhad P. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to penicillins, cephalosporins and aminoglycosides. Med J Tehran Univ. 1998; 4: 23-29. (Full text in Persian)
- 9- Mohajeri P. Antibiotic susceptibility and resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens in patients referred to the teaching hospitals in Kermanshah. Behbood. 2003; 4: 11-20. (Full text in Persian)
- 10- Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jul; 44(7):1818-24.
- 11- Imani Foolad AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods. J Ardabil Univ Med Sci. 2010; 10(3): 189-198. (Full text in Persian)
- 12- Rawat D, Hasan AS, Capoor MR, Sarma S, Nair D, Deb M, et al. In vitro evaluation of a new cefixime- clavulanic acid combination for gram negative bacteria. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2009 Jan; 40(1): 131-9.
- 13- Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in northern Italy. J Clin Microbiol. 2004 Jun; 42(6): 2523-9.
- 14- Saderi H, Owlia P, Hashemi SR. The Effect of essential oil of *Matricaria chamomilla* L. on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Iranian J Med Microbiol. 2007; (2): 9-14. (Full text in Persian)
- 15- Gilpin DF, Graham J, Elborn JS, Tunney MM. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured before and after antibiotic treatment of an acute exacerbation of pulmonary infection. J Cyst Fibros. 2008 Jun; 7( 2): S39.
- 16- Golovlev E. The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. Mikrobiologia. 2002 May-Jun; 71(3): 293-300.(Full text in Russian)
- 17- Tré-Hardy M, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. Int J Antimicrob Agents. 2008 Apr; 31(4): 329-36.
- 18- Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J Bacteriol. 1997 Sep; 179(18): 5756-67.

## Association between Exotoxin A (exo-A) Gene and Antibiotic Resistance Pattern with Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*

Imani Foolad AA, PhD<sup>1</sup>; Hosainzadeh M, MSc<sup>2</sup>; Mousavi SF, PhD<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Assistant Prof. of Microbial Products Research Center, Baqiyatallah Medical Sciences University (BMSU), Tehran, Iran

<sup>2</sup> Corresponding author: MSc Student of Microbiology Dept., School of Basic Sciences, Islamic of Azad University, Tehran, Iran. E-mail: hoseinzadeh\_maryam@rocketmail.com

<sup>3</sup> Assistant Prof. of Microbiology Dept., Institute Pasture of Iran, Tehran, Iran.

### ABSTRACT

**Background & Objectives:** *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative and aerobic bacterium. Exotoxin A is one of the important toxins produced by the bacterium and it is the main cause of mortality. About 90% of *P. aeruginosa* strains produce this toxin. Biofilm is a functional consortium of microorganisms attached to the body surfaces and bacteria are embedded in extracellular polymeric substances produced by the microorganisms. This bacterium is nontoxic in the planktonic form, but as a biofilm is highly toxic. In this study, we examined the association between the presence of *exo-A* gene and antibiotic resistance patterns with biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* strains.

**Methods:** In this study 110 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various infections with defined antibiotic resistance patterns were used. The PCR method was used to detect the presence or absence of Exotoxin A gene (*exo-A*). Ability of biofilm formation was evaluated by spectrophotometry. Association between *exo-A* gene and antibiotic resistance patterns with biofilms formation was analyzed statistically by Fishers and Chi-square tests.

**Results:** *exo-A* gene was detected in 93 strains (84.5%). Sixty two strains were multidrug resistant and they produced broad spectrum beta-lactamase enzyme. Results showed that, *exo-A* positive strains had significantly higher ability to biofilm formation in comparison with *exo-A* negative strains ( $p < 0.05$ ). Also the biofilm formation was significantly higher in multidrug resistant and ESBL producing strains ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results of this study indicate that there is a significant association between *exo-A* gene as well as antibiotic resistance pattern and ESBL producing with biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Because of importance of biofilms in the pathogenesis of this bacterium, our study could open a new window for investigation of the molecular processes involved in the formation of biofilms.

**Key words:** *Pseudomonas Aeruginosa*, Exotoxin A, Antibiotic Resistance Pattern, Biofilm