

توزیع عوامل حدت در ایزوله‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* مولد بیوفیلم جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در شهرکرد

حسن ممتاز^{۱*}، مهرانوش اسکندری^۲، فرزانه ذبیحی^۳

^۱ استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
^۲ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
^۳ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

چکیده

مقدمه: *پسودوموناس آئروژینوزا* یکی از شایع‌ترین میکروارگانیزم‌های مولد عفونت‌های بیمارستانی است که با داشتن تعداد زیادی از عوامل حدت در ایجاد عفونت‌های مختلف بالینی در انسان و حیوانات دخیل می‌باشد. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی ویرولانس در جدایه‌های مولد بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در شهرکرد انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۳۳ جدایه *پسودوموناس آئروژینوزا* از عفونت‌های مختلف بیمارستانی در بیماران ارجاعی به بیمارستان‌های سطح شهرستان شهرکرد طی شش ماه اول سال ۱۳۹۷ جداسازی گردید و توان تشکیل بیوفیلم در آن‌ها به روش میکروتیتر پلیت و حضور شایع‌ترین عوامل حدت شامل: ژن‌های *PilA, pilB, algD, algU, LasA, LasB, toxA, exoT, exoY, exoS, exoU, PLCN, plcH*، ژن‌های *apr* و *phzM, PhzH, PhzI, PhzII, Puda* (Polymerase Chain Reaction) PCR چندانگانه‌ای بررسی شد.

یافته‌ها: از میان جدایه‌های بالینی مورد بررسی در این مطالعه، ۳۰ جدایه توان تشکیل بیوفیلم قوی را داشتند که انواع ژن‌های مورد مطالعه در آن‌ها ردیابی گردید و دو ژن *exoT* و *exoU* به ترتیب با فراوانی حضور ۹۳/۳۳ و ۸۶/۶۶ درصد به‌عنوان شایع‌ترین فاکتورهای حدت شناسایی گردیدند.

نتیجه‌گیری: حضور انواع ژن‌های حدت به‌ویژه ژن‌های مولد آگزوتوکسین، *LasA* و *LasB* و ژن‌های مولد پیلی در جدایه‌های مولد بیوفیلم نشان‌دهنده نقش بالقوه این عوامل در تولید بیوفیلم و کلونیزه‌شدن *پسودوموناس آئروژینوزا* در سطوح اپیتلیال بدن می‌باشد.

کلمات کلیدی: *پسودوموناس آئروژینوزا*، تشکیل بیوفیلم، عفونت‌های بیمارستانی، عوامل حدت

مقدمه

پسودوموناس یک پاتوژن فرصت طلب شایع بیمارستانی است که مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های انسانی مانند عفونت‌های ادراری، تنفسی، پوستی، بافت‌های نرم، باکتری می، عفونت‌های استخوان و مفاصل، انواع عفونت‌های سیستمیک، عفونت در بیماران با سوختگی شدید و زخم بستر، بیماران مبتلا به ایدز و نیز سرطان که دچار سرکوب سیستم ایمنی هستند می‌باشد (۱،۲). پسودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی هوازی و غیر تخمیری متحرک بوده (۳) و یکی از مهم‌ترین باکتری‌های ایجادکننده بیوفیلیم می‌باشد (۴). این ارگانیزم اکسیداز مثبت است و کربوهیدرات را تخمیر نمی‌کند؛ اما بسیاری از سوش‌های آن گلوکز را اکسید می‌نمایند. معمولاً شناسایی ارگانیزم براساس مرفولوژی کلنی، مثبت بودن اکسیداز، حضور پیگمان‌های اختصاصی و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد (۵). از بین پسودوموناس‌ها، تنها پسودوموناس آئروژینوزا لیپاز مثبت است. باید توجه داشت که بیماری‌زایی پسودوموناس آئروژینوزا از طریق چسبندگی یا تولید مواد سمی ترشح شده اعمال می‌شود (۶). پسودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در طیف وسیعی از بیماران دارای نقص سیستم ایمنی می‌باشد (۷). مهم‌ترین عاملی که این باکتری را به‌عنوان یک عامل بیماری‌زا معرفی می‌کند این است که باکتری دارای مقاومت بالایی نسبت به طیف وسیعی از مواد ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۸، ۱). پسودوموناس آئروژینوزا بیشتر در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول پایداری می‌کند؛ اما برخی از گونه‌های آن به جنتامایسین، توبرامایسین، کولیسین، نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین پاسخ می‌دهند (۹). مطالعات نشان داده‌اند که تشکیل بیوفیلیم توسط باکتری می‌تواند یک واکنش اختصاصی باکتری برای دفاع در برابر آنتی‌بیوتیک باشد. با توجه به این موضوع

می‌توان داروها و راه‌کارهای جدیدی را برای درمان عفونت‌های مزمن ناشی از باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم طراحی نمود (۱۰). از جمله تکنیک‌های مقابله با تشکیل بیوفیلیم می‌توان به تغییر پوشش سطحی و استفاده از پوشش ضد باکتریایی روی وسایل پزشکی مانند کاتتر و آنژیوکت که به نام پوشش سطحی فعال معروف هستند، اشاره کرد. تکنیک‌های فیزیکی نیز شامل: امواج اولتراسوند با فرکانس پایین، تکنیک فتودینامیک و سیستم پلیمری می‌باشند (۱۱-۱۴). از آنجایی که پسودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل اصلی ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بوده و عوامل حدت مختلفی در پاتوژنز آن دخالت می‌کنند و نیز با توجه به اینکه بیشتر سویه‌های این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان بیماری‌های عفونی مقاوم هستند و بیشتر مطالعات بر پایه ارتباط بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توان تشکیل بیوفیلیم صورت گرفته‌اند، پژوهش حاضر با هدف تعیین الگوی ویرولانس در جدایه‌های مولد بیوفیلیم پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در شهرکرد طرح‌ریزی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی ویرولانس در جدایه‌های مولد بیوفیلیم پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی طی شش ماه اول سال ۱۳۹۷ به شرح زیر انجام شد.

نمونه‌گیری

در مطالعه حاضر ۱۰۰ نمونه از عفونت‌های مختلف بالینی در انسان شامل: زخم‌های سطحی چرکی، عفونت‌های تنفسی، عفونت‌های دستگاه ادراری، زخم بستر و سوختگی از بیماران مراجعه‌کننده به دو بیمارستان سطح

استخراج DNA

جهت استخراج DNA (Deoxyribonucleic Acid) جهت استخراج ژنومی از جدایه‌های جدا شده از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری (رشد یافته در محیط مایع BHI) در یک میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی به‌عنوان منبع DNA جدا گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳).

تأیید مولکولی جدایه‌ها

به‌منظور تأیید قطعی جدایه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* جدایش PCR با استفاده از ردیابی ژن 16srDNA در نمونه‌ها استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن فوق در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. باید خاطر نشان ساخت که در تمام مراحل انجام PCR از سویه استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا* ATCC10145 (American Type Culture Collection) تهیه شده از مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

آزمایش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Flex², Germany) انجام شد. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۱ میلی‌مول (۱ میکرولیتر) MgCl₂، ۱۵۰ میکرومول (۰/۳۷۵ میکرولیتر) dNTP Mix، ۱ واحد آنزیم (۰/۲ میکرولیتر) Taq DNA Polymerase (ساخت شرکت سیناژن، ایران)، ۱

شهرستان شهرکرد تهیه گردیدند و به‌منظور جداسازی گونه *پسودوموناس آئروژینوزا* در محل نمونه‌گیری در محیط غنی‌کننده آب پپتونه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند (۱۵). شایان ذکر می‌باشد که نمونه‌های غنی‌شده به‌منظور استفاده در مطالعات بعدی همراه با یخ به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد انتقال داده شدند.

جداسازی و شناسایی باکتری

در این مرحله باکتری غنی‌شده در محیط آب پپتونه به‌صورت متراکم در محیط کشت انتخابی PCA (*Pseudomonas Cetrinide Agar*) کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های مشکوک به *پسودوموناس* (کلنی‌های واجد رنگ‌دانه سبز- آبی با بوی مخصوص انگور فاسدشده) انتخاب گردیدند و به‌منظور تأیید گونه *آئروژینوزا*، آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر تخمیر قند لاکتوز، مصرف سیترات، اندول، اکسیداز، فعالیت اکسیدکنندگی در محیط (Oxidative) OF (Fermentative) DNase (Deoxyribonuclease) و همولیز در محیط آگار خون‌دار روی آن‌ها انجام شد. کلنی‌هایی که واجد باکتری‌های لاکتوز منفی، سیترات مثبت، اندول منفی، اکسیداز مثبت، اکسیدکننده و هوازی اجباری، DNase منفی و همولیتیک بودند به‌عنوان کلنی *پسودوموناس آئروژینوزا* انتخاب گردیدند و برای استفاده در مطالعات بعدی در محیط مایع BHI (Brain Heart Infusion) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند (۹).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن 16srDNA در جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* (۱۶)

اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر 5'-3'	ژن
۹۵۶	F: GGGGATCTTCGGACCTCA R: TCCTTAGAGTGCCCCACCCG	16srDNA

ردیابی ژن‌های کدکننده عوامل حدت

به‌منظور ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت در جدایه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جداشده از عفونت‌های بیمارستانی از زوج پرایمرهای نشان‌داده‌شده در جدول ۲ استفاده شد (۹).

بر مبنای اندازه قطعات ژنی مورد مطالعه، واکنش PCR در قالب سه واکنش PCR چندگانه (Multiplex PCR) با شرایط ذکرشده در جدول ۳ انجام شد (۹).

به‌منظور ارزیابی محصول PCR و تشخیص قطعه ژنی

میکرومول (۱ میکرولیتر) از زوج پرایمرهای R و F (ساخت شرکت سیناژن، ایران) و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه تنظیم گردید.

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه؛ ۳۰ سیکل تکراری با دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه؛ یک سیکل انتهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های حدت در جدایه‌های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
<i>LasB</i>	lasB F: GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC lasB R: TGGCGTCGACGAACACCTCG	۲۸۴
<i>ToxA</i>	tox A F: CTGCGCGGGTCTATGTGCC tox A R: GATGCTGGACGGGTCGAG	۲۷۰
<i>PlcH</i>	plcH F: GCACGTGGTCATCCTGATGC plcH R: TCCGTAGGCGTCGACGTAC	۶۰۸
<i>PlcN</i>	plcN F: TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG plcN R: TCGCTGTCGAGCAGGTCGAAC	۴۸۱
<i>exoS</i>	exoS F: CGTCGTGTTCAAGCAGATGGTGCTG exoS R: CCGAACCGCTTCACCAGGC	۴۴۴
<i>ExoT</i>	exoT F: CAATCATCTCAGCAGAACCC exoT R: TGTCGTAGAGGATCTCCTG	۱۱۵۹
<i>ExoY</i>	exoY F: TATCGACGGTCATCGTCAGGT exoY R: TTGATGCACTCGACCAGCAAG	۱۰۳۵
<i>exoU</i>	exoU F: GATTCCATCACAGGCTCG exoU R: CTAGCAATGGCACTAATCG	۳۳۰۸
<i>apr</i>	apr F: TGTCCAGCAATTCTCTTGC apr R: CGTTTTCCACGGTGACC	۱۰۱۷
<i>phzII</i>	phzII F: GCCAAGGTTTGTGTGTCGG phzII R: CGCATTGACGATATGGAAC	۱۰۳۶
<i>phzM</i>	phzM F: ATGGAGAGCGGGATCGACAG phzM R: ATGCGGGTTCCATCGGCAG	۸۷۵
<i>phzS</i>	phzS F: TCGCCATGACCGATAACGCTC phzS R: ACAACCTGAGCCAGCCTTCC	۱۷۵۲
<i>phzI</i>	phzI F: CATCAGCTTAGCAATCCC phzI R: CGGAGAACTTTTCCCTC	۳۹۲
<i>phzH</i>	phzII F: GGGTTGGGTGGATTACAC phzII R: CTCACCTGGGTGTTGAAG	۱۷۵۲
<i>lasA</i>	lasA F: GCAGCACAAAAGATCCC lasA R: GAAATGCAGGTGCGGTC	۱۰۷۵
<i>pvdA</i>	pvdA F: GACTCAGGCAACTGCAAC pvdA R: TTCAGGTGCTGGTACAGG	۱۲۸۱
<i>pilA</i>	pilA F: ACAGCATCCAAGTACGCG pilA R: TTGACTTCTCCAGGCTG	۱۶۷۵
<i>pilB</i>	pilB F: TCGAACTGATGATCGTGG pilB R: CTTTCGGAGTGAACATCG	۴۰۸

جدول ۳: شرایط واکنش PCR جهت ردیابی عوامل حدت در پسودوموناس آئروژینوزا (۹)

نام ژن	برنامه حرارتی	شرایط PCR (حجم = ۵۰ میکرولیتر)
<i>PhzM</i> , <i>exoU</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i> , <i>PlcN</i> , <i>PlcH</i> , <i>LasB</i>	۱ سیکل	PCR buffer 10X = ۵ میکرولیتر Mgcl2 = ۱/۵ میلی مول dNTP mix = ۲۰۰ میکرومول پرایمر F و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلیمرز = ۱ واحد DNA = ۴ میکرولیتر
	۹۵ درجه سانتی‌گراد-----۵ دقیقه	
	۳۲ سیکل	
	۹۴ درجه سانتی‌گراد-----۶۰ ثانیه	
	۵۸ درجه سانتی‌گراد-----۶۰ ثانیه	
<i>phzHpilB</i> , <i>apr</i> , <i>exoS</i> , <i>toxA</i>	۱ سیکل	PCR buffer 10X = ۵ میکرولیتر Mgcl2 = ۲ میلی مول dNTP mix = ۲۰۰ میکرومول پرایمر F و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلیمرز = ۱/۵ واحد DNA = ۵ میکرولیتر
	۹۴ درجه سانتی‌گراد-----۶ دقیقه	
	۳۴ سیکل	
	۹۵ درجه سانتی‌گراد-----۵۰ ثانیه	
	۵۵ درجه سانتی‌گراد-----۷۰ ثانیه	
<i>PhzI</i> , <i>PhzS</i> , <i>PhzII</i> , <i>algD</i> , <i>PilA</i> , <i>LasAPvdA</i> , <i>algU</i>	۱ سیکل	PCR buffer 10X = ۵ میکرولیتر Mgcl2 = ۲/۵ میلی مول dNTP mix = ۲۵۰ میکرومول پرایمر F و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلیمرز = ۲ واحد DNA = ۵ میکرولیتر
	۹۴ درجه سانتی‌گراد-----۶ دقیقه	
	۳۶ سیکل	
	۹۴ درجه سانتی‌گراد-----۶۰ ثانیه	
	۵۸ درجه سانتی‌گراد-----۹۰ ثانیه	
۷۲ درجه سانتی‌گراد-----۹۰ ثانیه		
۱ سیکل	۷۲ درجه سانتی‌گراد-----۱۰ دقیقه	

در انتها باقی مانده و به رنگ بنفش مشاهده می‌شوند؛ اما باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سطوح را نداشته باشند، حذف می‌گردند. برای بررسی توان تشکیل بیوفیلم در این باکتری، ابتدا یک لوپ پر از کلنی باکتری به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط TSB (Trypticase Soy Broth) (ساخت شرکت Merck، آلمان) تلقیح شد و این لوله‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از گذشت این مدت و فعال شدن باکتری‌ها، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل TSB تلقیح گشت. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر

تکثیر یافته در هر کدام از مراحل PCR از روش الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت و پس از اتمام آن، از طریق مشاهده زیر نور UV (Ultraviolet) در دستگاه Uvitec از ژل به دست آمده تصویربرداری گردید و ثبت شد.

بررسی تولید بیوفیلم در پسودوموناس آئروژینوزا: برای بررسی توان تشکیل بیوفیلم در پسودوموناس آئروژینوزا از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. شایان ذکر است باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سطوح را داشته باشند

Fisher و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق SPSS 20 آنالیز شدند و وجود ارتباط آماری معنادار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) بین آن‌ها تأیید گردید.

نتایج

از میان ۱۰۰ نمونه عفونی گرفته‌شده از بیماران ارجاعی به بیمارستان‌های سطح شهرستان شهرکرد، ۳۳ جدایه پسودوموناس آئروژینوزا جداسازی گردید که تمام جدایه‌ها در آزمایش PCR واجد قطعه ۹۵۶ جفت بازی مربوط به ژن 16srDNA بودند. ژل حاصل از ردیابی این ژن در شکل ۱ نشان داده شده است.

بر مبنای نتایج از ۳۳ جدایه پسودوموناس آئروژینوزای جداشده، ۳۰ جدایه توان تشکیل بیوفیلیم قوی، ۲ جدایه توان تشکیل بیوفیلیم متوسط و ۱ جدایه توان تشکیل بیوفیلیم ضعیف را داشتند. در تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از بررسی توان تشکیل بیوفیلیم در جدایه‌های مورد مطالعه مشخص شد که اختلاف آماری معناداری بین جدایه‌های مولد بیوفیلیم قوی با دو گروه دیگر وجود دارد ($P = 0.036$).

از سوی دیگر، حضور شایع‌ترین ژن‌های مولد عوامل حدت در ۳۳ جدایه مورد مطالعه بررسی گردید که توزیع انواع ژن‌های مورد بررسی در سه گروه تشکیل‌دهنده بیوفیلیم در جدول ۴ و نتایج حاصل از PCR تعدادی از این ژن‌ها در شکل ۲ ارائه شده است.

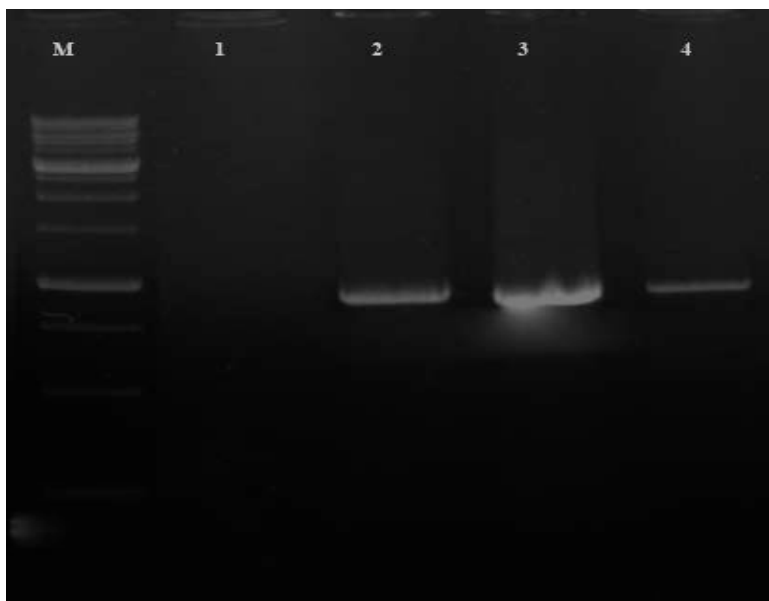
مطابق با اطلاعات جدول فوق تمام ژن‌های حدت مورد مطالعه در جدایه‌های گروه تشکیل‌دهنده بیوفیلیم قوی ردیابی شدند که در این میان، ژن *exoU* با فراوانی ۹۳/۳۳ درصد و ژن‌های *exoT* و *PlcH* با فراوانی ۸۶/۶۶ درصد شایع‌ترین ژن‌های حدت ردیابی شده در این گروه بودند.

در تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از جدول فوق، اختلاف آماری معناداری بین حضور ژن‌های *pilB*، *pvdA* و *phzI* با سایر ژن‌های حدت مشاهده شد ($P = 0.041$).

از محیط ۱۰ میلی‌لیتری در داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. لازم به ذکر می‌باشد که در چاهک شاهد تنها محیط کشت استریل TSB ریخته شد. جنس میکروتیتر پلیت‌ها از پلی‌استیرین است و هرکدام دارای ۸ ردیف و ۱۲ ستون می‌باشند. پس از تلقیح، درب پلیت‌ها گذاشته شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از گذشت این مدت، محتوای داخل چاهک‌ها خالی شد و شست و شوی چاهک‌ها سه بار توسط سرم فیزیولوژی استریل صورت گرفت. در این مرحله پلیت‌ها به شدت تکان داده شدند تا سلول‌های غیرمتصل حذف گردند. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به چاهک‌ها اضافه شد تا سلول‌ها تثبیت گردند. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد و سطح پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه خشک گردید. سپس، هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله (CV: Crystal Violet) ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه انکوبه گشت و در ادامه، چاهک‌ها به آرامی با آب شهری شسته شدند و با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به‌عنوان حلال پر گردیدند. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری چاهک‌های رنگ‌شده با کریستال ویوله در ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت‌کننده الیزا خوانده شد و آن‌ها براساس OD (Optical Density) در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی گردیدند؛ ایزوله‌هایی که OD مساوی یا بالاتر از ۳ درصد داشتند به‌عنوان بیوفیلیم قوی، ایزوله‌های با OD بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۲۹۹ به‌عنوان بیوفیلیم متوسط، ایزوله‌های با OD بین ۰/۱۰۰ تا ۰/۱۹۹ به‌عنوان بیوفیلیم ضعیف و ایزوله‌های با OD کمتر از ۰/۱۰۰ به‌عنوان بیوفیلیم منفی در نظر گرفته شدند (۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری

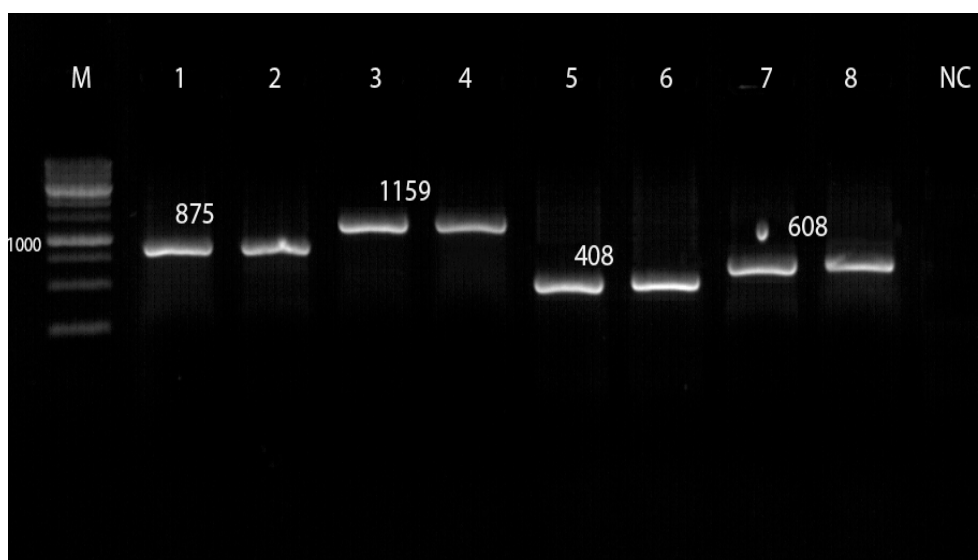
داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری



شکل ۱: ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *nanI* (ستون M= مارکر ۱ کیلو بازی DNA؛ ستون ۱= نمونه کنترل منفی؛ ستون ۲= نمونه کنترل مثبت؛ ستون‌های ۳ و ۴= نمونه‌های مثبت مورد مطالعه)

جدول ۴: توزیع انواع ژن‌های کدکننده عوامل حدت در جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزای* تشکیل‌دهنده بیوفیلم

<i>plcN</i>	<i>plcH</i>	<i>AlgU</i>	<i>algD</i>	<i>toxA</i>	<i>pilB</i>	<i>pilA</i>	<i>pvdA</i>	<i>lasB</i>	<i>lasA</i>	<i>phzS</i>	<i>phzI</i>	<i>phzM</i>	<i>phzII</i>	<i>apr</i>	<i>phzH</i>	<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	بیوفیلم
۲۴	۲۶	۱۹	۱۹	۱۹	۱۲	۱۴	۸	۱۲	۱۸	۱۷	۱۳	۱۷	۱۶	۲۰	۱۹	۲۸	۱۸	۲۱	۲۶	قوی ۳۰
۱	۱	۱	۱	۲	۱	۱	-	۲	۱	-	-	-	۱	۲	۲	۱	۱	-	۱	متوسط ۲
-	-	-	-	-	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	۱	-	-	-	-	-	ضعیف ۱



شکل ۲: ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن‌های *phzM* (قطعه ۸۷۵ جفت بازی)، *exoT* (قطعه ۱۱۵۹ جفت بازی)، *pilB* (قطعه ۴۰۸ جفت بازی) و *plcH* (قطعه ۶۰۸ جفت بازی) (ستون M= مارکر ۱ کیلو بازی DNA؛ ستون NC= نمونه کنترل منفی)

بحث

algU بودند که این امر با مطالعه فوق همراستا است. با وجود بالابودن درصد پسودوموناس آئروژینوزاهای دارای ژن *exoA* می‌توان این باکتری‌ها را دارای ویرولانسی بیشتر در نظر گرفت. همچنین با توجه به بالابودن درصد تشکیل بیوفیلیم در این نمونه‌ها می‌توان گفت که احتمال نقش داشتن *exoA* در تشکیل بیوفیلیم وجود دارد (۱۷، ۱۸).

مطالعات زیادی در زمینه تأثیر محصول ژن‌های *las* (که القاگر آسپیل هموسرین لاکتون در پسودوموناس آئروژینوزا هستند) با توان تشکیل بیوفیلیم در این باکتری صورت گرفته‌اند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که ضخامت بیوفیلیم تولیدشده در باکتری‌های دارای نقص در این ژن، تنها معادل ۲۰ درصد از بیوفیلیم طبیعی در باکتری‌های واجد این ژن‌ها است (۱۸). در مطالعه حاضر ۶۰ درصد از جدایه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم قوی حامل ژن *lasA* و ۴۰ درصد از آن‌ها واجد ژن *lasB* بودند. این درحالی است که جدایه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم ضعیف دارای هیچ‌کدام از این ژن‌ها نبودند که این امر تأییدکننده مطالعه فوق می‌باشد.

از دیگر فاکتورهای حدت بررسی‌شده در مطالعات قبلی، ژن‌های مولد اگزوتوکسین‌های پسودوموناسی از جمله ژن‌های *exoA*، *exoU* و *exoS* می‌باشند. در مطالعه‌ای که در مورد جدایه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جدادشده از موارد کراتیت انجام شد، از ۵۴ جدایه مورد مطالعه، ۵۱ جدایه واجد ژن *exoU* و ۳۴ جدایه حامل ژن *exoS* بودند (۱۹).

همچنین در مطالعه ایمانی فولادی و همکاران در ایران، ارتباط آماری معناداری بین حضور ژن *exoA* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تشکیل بیوفیلیم توسط پسودوموناس آئروژینوزا مشاهده گردید (۱۸).

در مطالعه حاضر نیز نقش بالقوه ژن‌های مولد اگزوتوکسین در تشکیل بیوفیلیم به اثبات رسید و ژن‌های *exoT* و *exoU* با فراوانی ۹۳/۳۳ و ۸۶/۶۶ درصد

ارتباط بین تشکیل بیوفیلیم در باکتری‌ها عموماً با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته و کمتر به ارزیابی الگوی ویرولانسی باکتری در تشکیل بیوفیلیم پرداخته شده است.

پسودوموناس آئروژینوزا یکی از شایع‌ترین میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت زخم و عفونت‌های قرنیه است که بیماری‌زایی آن به دلیل تولید چندین فاکتور ویرولانسی همراه با سلول یا فاکتورهای خارج سلولی می‌باشد (۳). در این ارتباط، در مطالعه حاضر توزیع شایع‌ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت در جدایه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم در پسودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده حضور انواع فاکتورهای حدت در این جدایه‌ها به‌ویژه جدایه‌های مولد بیوفیلیم قوی بود.

ذکر این نکته ضرورت دارد که عناصر تشکیل‌دهنده بیوفیلیم در پسودوموناس آئروژینوزا بر روی سطوح جامد زیستی، محیط‌های آبی و یا دارای رطوبت کافی قرار دارند؛ از جمله سطح گیاهان آبی و رسوبات پایین دریاچه‌ها و حوضچه‌ها در مناطق معتدل.

Golovlev در پژوهشی به بررسی مکانیسم عمل بیوفیلیم و مراحل تشکیل آن در پسودوموناس آئروژینوزا به تفصیل بیان از دو سنتز آلژینات و تنظیم ژن‌های *algD*، *algC*، *algB* و *algZ* که از عوامل مؤثر در تشکیل بیوفیلیم هستند، پرداخت. باید عنوان نمود که *algA* به‌طور عمده توسط پروتئین AlgU تنظیم می‌شود که این پروتئین به‌عنوان سیستم نظارتی سنتز آلژینات در نظر گرفته شده است و رژیم اصلی سنتز آلژینات، ترتیب رونویسی را مدوله می‌کند و از عوامل اصلی مؤثر در تشکیل بیوفیلیم می‌باشد. در مطالعه حاضر ۶۳/۳۳ درصد از جدایه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم قوی حامل دو ژن *algD* و

اطلاعاتی نظیر سن، جنس و شغل بیماران مورد مطالعه، امکان ارزیابی این متغیرها با فراوانی جدایه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* امکان‌پذیر نبود.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده حضور انواع ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس در جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* و نقش مهم ژن‌های حدت به‌ویژه ژن‌های *exoT* و *exoU* واقع در جزایر بیماری‌زایی باکتری در ایجاد بیوفیلم به‌عنوان یک فاکتور مهم بیماری‌زایی و کلونیزه‌شدن *پسودوموناس آئروژینوزا* بود. در این راستا توصیه می‌شود که در مطالعات بعدی علاوه بر الگوی ویروالانس، حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فاکتورهای حدت همزمان در جدایه‌های مولد بیوفیلم در عفونت‌های مختلف دامی و انسانی نیز ارزیابی گردند.

حمایت مالی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده و با حمایت مالی حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه‌ها با هماهنگی بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و با رضایت کامل بیماران اخذ شدند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و مقاله با اطلاع و هماهنگی آن‌ها ارسال شده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از زحمات مدیریت محترم

شایع‌ترین ژن‌های حدت ردیابی‌شده در جدایه‌های مولد بیوفیلم قوی بودند.

باید عنوان نمود که جزایر بیماری‌زای *Pap I-1,2* در سوبه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* و نقش این جزایر در گسترش روند بیماری‌زایی و عفونت باکتریایی چندان مورد بررسی قرار نگرفته است. در این ارتباط، Harison و همکاران در سال ۲۰۱۰ در دانشگاه Leicester آمریکا بررسی‌های متعددی را در ارتباط با جزایر بیماری‌زای *Pap I-1,2* سوبه *PAI4* *پسودوموناس آئروژینوزا* انجام دادند و سوبه *PAI4* را با سوبه *PAOI* مقایسه کردند. نتایج نشان‌دهنده قدرت تهاجمی بیشتر سوبه *PAI4* به دلیل داشتن جزایر بیماری‌زا بود (۲۰).

Mattick (۲۰۰۲) نیز روند انتقال ژن که از طریق پیلی (Pili) نوع چهارم جزیره *Pap I-1* صورت می‌گیرد را در ۴۲ سوبه *پسودوموناس آئروژینوزا* بررسی نمود و به این نتیجه دست یافت که *پسودوموناس آئروژینوزا* از طریق مکانیسم جفت‌گیری به واسطه پیلی نوع چهارم، روند انتقال عناصر ژنتیکی را انجام می‌دهد. در این پژوهش نیمی از نمونه‌های مورد مطالعه دارای جزیره بزرگ بیماری‌زایی یعنی *Pap I-1* بودند (۲۱).

حضور ژن‌های کدکننده پیلی از جمله *PilA* و *PilB* در جزیره بیماری‌زایی *Pap I-1* از مهم‌ترین عواملی است که در پاتوژن باکتری نقش دارد و باعث تسهیل چسبیدن باکتری به سطوح مختلف از جمله سطوح اپیتلیال میزبان می‌شود (۲۲). در مطالعه حاضر ۴۶/۶۶ و ۴۰ درصد از ایزوله‌های مولد بیوفیلم قوی واجد ژن‌های *PilA* و *PilB* بودند که این امر نشان‌دهنده نقش بالقوه این ژن‌ها در اولین مرحله پاتوژن باکتری و اتصال به سلول میزبان می‌باشد و با مطالعات قبلی همخوانی دارد.

در پایان باید گفت که از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر این است که متأسفانه به دلیل در دسترس نبودن

واحد شهرکرد؛ جناب آقای مهندس صفری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروپشناسی دانشگاه آزاد اسلامی

References

1. Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey GP, Rolston KV, Tarrand JJ, Samonis G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: retrospective analysis of 245 episodes. *Arch Intern Med*. 2000; 160(4):501-9.
2. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(1):43-8.
3. Wolska K, Szveda P. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Pol J Microbiol*. 2009; 58(3):255-60.
4. Azizian R, Azizi Jalilian F, Askari H, Naser A, Karimi S, Sadeghifard N, et al. Bacteriophage as a new candidate for the prevention and removal of biofilms. *J Ilam Uni Med Sci*. 2013; 20(5):84-93. [in Persian]
5. Bagheri F, Rohani H, Falahati Rastegar M, Saberi Risse R. Relationship between two phenomena of phase variation and biofilm formation in *Pseudomonas* fluorescent and their ability to control the biological control of wheat hemp disease by *Gaeumannomyces graminis vartritici*. *J Plant Protect*. 2013; 26(4):380-8. [in Persian]
6. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 2001; 183(21):6454-65.
7. Kanani M, Khadiri T, Khazaei S, Madani SH, Malekianzadeh E. Study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to Ceftizidim and imipenem in Kermanshah Imam Reza hospital during 2006-2011. *Yafte*. 2014; 15(4):52-60. [in Persian]
8. Javadi A, Rostamirad M, Zand Monfared MR, Dastjani Farahani F, Heidarpour A, Khodadad Motlagh O. The effect of ampicillin and gentamicin conjugated with gold nanoparticles on the formation of biofilms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Qom Univ Med Sci J*. 2015; 9(5):35-41. [in Persian]
9. Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. *Iran Red Crescent Med J*. 2014; 16(10):e15722.
10. Ghotaslou R, Salahi Eshlaqghi B. Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and new preventive measures and anti-biofilm agents. *J Rafsanjan Univ Med Sci*. 2013; 12(9):747-68. [in Persian]
11. Azimi SZ, Ghane M, Heshmatipour Z. The antibiotic resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from different wards of Shahid Rajai Hospital in Tonekabon, 2010-2011. *Med Lab J*. 2013; 7(2):23-9. [in Persian]
12. Characklis WG. Bioengineering report: fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnol Bioengin*. 1981; 23(9):1923-60.
13. Javadi MS, Neurozi J, Emami M. Investigating the pollution of hospital equipment. *Microbiol Knowl*. 2009; 2(5):11-7. [in Persian]
14. Tabasi M, Javadinia S, Masoumi Asl H, Nemati AH, Azizian R, Alipour M, et al. Survey of antibiotic resistance and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with urinary tract infection. *Iran J Infect Dis*. 2017; 22(77):63-8. [in Persian]
15. Adibfar P. Medical microbiology for undergraduate medical students, paramedical and specialized fields. 1st ed. Tehran, Iran: Noore Danesh Publisher; 2000. P. 85-100. [in Persian]
16. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(5):2074-9.
17. Golovlev EL. The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. *Mikrobiologiya*. 2002; 71(3):293-300.
18. Imani Foolad A, 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. [in Persian]
19. Liang X, Pham XQ, Olson MV, Lory S. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2001; 183(3):843-53.
20. Harrison EM, Carter ME, Luck S, Ou HY, He X, Deng Z, et al. Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect Immun*. 2010; 78(4):1437-46.
21. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*. 2002; 56:289-314.
22. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol*. 2006; 7(10):R90.

Original Article

Distribution of Virulence Factors in Biofilm Formation Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Hospital Infections in Shahrekord, Iran

Hassan Momtaz^{1*}, Mehrnoush Eskandari², Farzaneh Zabihi³

¹ Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

² MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

³ MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Received: 11 November 2018

Accepted: 20 December 2018

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is one of main sources of hospital infections, which has many virulence factors and causes different clinical infections in humans and animals. This study was performed to investigate the relationship between biofilm formation and virulence factors distributed in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples of hospitals in Shahrekord, Iran.

Materials and Methods: This study was conducted on 33 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical infections. The strains were from the patients hospitalized in Shahrekord hospitals and treatment centers in the first 6 months of 2018. Biofilm formation was investigated through the microtiter plate method and most commonly virulence factors, including *pudA*, *phzI/II/H/M*, *apr*, *picH/N*, *exoU/S/Y/T*, *toxA*, *lasA/B*, *algD/U*, and *pilA/B* genes, were analyzed using multiplex polymerase chain reaction method.

Results: In this study, 30 isolates had the ability to form a powerful biofilm. Among the investigated genes, *exoU* and *exoT* genes with the frequency of 93.33 % and 86.66%, were recognized as the most common virulence factors, respectively.

Conclusion: The presence of some virulence genes, especially exotoxin, *lasA/B*, and Pili genes in these isolates indicated the important role of these factors in *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm formation and colonization of epithelial surfaces.

Keywords: Biofilm formation, Hospital infections, *Pseudomonas aeruginosa*, Virulence factors
