

Prevalence of *phzM* and *pvdA* virulence genes in *pseudomonas aeruginosa* isolated from Infectious disease ward patients

Javid Rad E., MSc¹, Keshavarzi F., PhD²

1. Department of Microbiology, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Genetics, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-87-33287652, fkeshavarzi@iausdj.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causes of nosocomial infections and septicemia in patients with burn and cystic fibrosis. It is found in water and wet soil. *PhzM* and *PvdA* are virulence genes involved in the production of two iron carriers, pyoverdine and pyocyanin. Considering the importance of virulence genes in the bacteria, determination of the frequency of these genes in clinical and environmental samples has shown an increasing trend. The aim of this study was to investigate the prevalence of virulence genes in *pseudomonas aeruginosa* isolated from infected patients.

Material and Method: Clinical samples were obtained from the patients referring to Kermanshah hospitals. After isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains, DNA extraction was performed by Sina Kit gene and the presence of genes evaluated by PCR. Data were analyzed by using SPSS v20 software.

Results: Among 106 strains, 34 (32.07%) and 47 (44.33%) strains were positive for *pvdA* and *phzM* genes, respectively. The logistic regression analysis revealed significant correlations between the presence of *pvdA* gene and samples of urine ($p<0.001$), blood ($p=0.002$), wound ($p=0.004$) and lung secretion ($p=0.013$). Foremore, there was no relationship between the presence of *phzM* gene and the above mentioned samples.

Conclusion: We found moderate prevalence rates for *phzM* and *pvdA* virulence genes in *pseudomonas aeruginosa* isolated from Kermanshah hospitals.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence genes, *phzM*, *pvdA*.

Received: Mar 15, 2017 **Accepted:** Sep 24, 2017

بررسی شیوع ژن‌های بیماری‌زای *phzM* و *pvdA* در سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از بیماران بخش عفونی

الهه جاویدراد^۱، فاطمه کشاورزی^۲

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

۲. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران (مولف مسؤل)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۳۲۸۷۶۵۲

f.keshavarzi@iausdj.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: باکتری سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و سپتی‌سمی در بیماران بخش سوختگی و افراد مبتلا به بیماری سیستمیک فیروزیس است که در آب و خاک مرطوب نیز یافت می‌گردد. از ژن‌های بیماری‌زای درگیر در تولید دو ناقل آهن در باکتری یعنی پیووردین و پیوسیانین، *pvdA* و *phzM* می‌باشد. با توجه به اهمیت ژن‌های بیماری‌زا در باکتری‌ها روز به روز تعیین فراوانی آن‌ها در نمونه‌های بالینی باکتری‌های پاتوژن بیشتر می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی شیوع این دو ژن در سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از بیماران عفونت یافته می‌باشد.

روش بررسی: نمونه‌های بالینی از افراد بیماری که به بیمارستان‌های کرمانشاه مراجعه کرده‌اند، گرفته شد. پس از جداسازی و شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا استخراج DNA با کیت سیناژن صورت گرفت و وجود ژن‌ها مذکور توسط PCR ارزیابی شد. در نهایت داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS v20 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در میان ۱۰۶ سویه‌ی جدا شده ۳۴ سویه (۳۲/۰۷ درصد) و ۴۷ سویه (۴۴/۳۳ درصد) بترتیب برای ژن‌های *pvdA* و *phzM* مثبت بودند. آنالیز رگرسیون لجستیک نشان داد که بین حضور ژن *pvdA* و نمونه‌های گرفته شده از ادار با p برابر با ۰/۰۰۱، خون با p برابر با ۰/۰۰۲، زخم با p برابر با ۰/۰۰۴، و ریه با p برابر با ۰/۰۱۳ ارتباط معنی داری وجود دارد. بعلاوه، بین حضور ژن *phzM* و نمونه‌های گرفته شده کلا هیچ رابطه‌ای یافت نشد.

نتیجه‌گیری: شیوع ژن‌های بیماری‌زای *pvdA* و *phzM* در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای کرمانشاه متوسط بود.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، ژن‌های بیماری‌زای، *pvdA*، *phzM*

وصول مقاله: ۹۵/۱۲/۲۵ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۶/۲۷ پذیرش: ۹۶/۷/۲۰

مقدمه

سودوموناس ها باکتری های گرم منفی هستند با بیش از ۱۲۰ گونه بوده که در محیط های مرطوب مانند آب و خاک یافت می شوند (۱). همچنین این جنس به عنوان پاتوژن ارگانسیم های مختلف مانند گیاهان، حیوان ها، مخمرها، نماتودها، حشرات و انسان شناسایی شده است (۲). سودوموناس آئروژینوزا شایع ترین عامل عفونت جدا شده از دستگاه تنفسی بیماران دچار نقص ایمنی، فیروز کیستیک (۳) و مسئول بخش قابل توجهی از پنومونی اکتسابی در جامعه است (۴).

برخی فاکتورهای ویروالانس در این باکتری احتمالا مربوط به ویژگی های باکتری برای جلوگیری از شکار توسط باکتری های دیگر می باشد که در محیط اطراف ساکن شده اند (۵). این توانایی ناشی از وجود یک ژنوم بزرگ و پیچیده است که چندین فاکتور ویروالانس به همراه سلول و فاکتورهای خارج سلولی شامل آلزینات، آگزوتوکسین ها، الاستاز، پروتئاز و پروتئین های سیستم ترشحی تیپ ۳ را کد می کند (۶). برخی از فاکتورهای ویروالانس نیز برای بیماری زایی این باکتری ضروری هستند (۷). بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا مربوط به چندین فاکتور بیماری زایی وابسته و خارج سلولی است که می تواند طیف وسیعی از عفونت های شدید را ایجاد کنند. فاکتورهای وابسته به سلول شامل تازک، پیلی، لیپوپلی ساکارید، آلزینات / ییوفلم، ادهزین های غیرپیلوس و فاکتورهای خارج سلولی مهم پروتئازها، همولیزین، آگزوتوکسین A، آگزوتانزیم S، پیوسیانین و سیدروفور می باشند (۸). اهمیت هر کدام از این فاکتورها وابسته به جایگاه و ماهیت عفونت است (۵).

پیوسیانین (PCN) ترکیب آروماتیک حاوی نیتروژن متعلق به ترکیبات کلاس فنازین سه حلقه ای است (۹ و ۱۰). مطالعاتی چند عملکرد پیوسیانین را در بیماری زایی سودوموناس و توانایی سمی بودن پیوسیانین نشان داده

است (۱۱-۱۳). این تحقیقات نشان داده اند که پیوسیانین اثرات آنتاگونیستی متعدد بر روی میزبان هم در شرایط داخل سلولی و هم در شرایط لوله آزمایش دارد. از جمله این اثرات رها سازی رادیکال های آزاد و اثرات التهابی است که منجر به آسیب و مرگ سلولی می شود (۱۱-۱۳). تا کنون بیشترین مطالعات در باره ی بررسی اثرات پیوسیانین بر مجاری هوایی انسان بوده است. اخیرا در چندین مطالعه به بررسی اثرات پیوسیانین بر اندام های دیگر به خصوص مجاری ادراری (۱۴ و ۱۲)، سیستم قلبی عروقی (۱۵)، سیستم کبدی (۱۶ و ۱۷) و سیستم عصبی مرکزی (۱۸) پرداخته اند.

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک باکتری هوازی (۱۹)، نیاز زیادی به آهن دارد. سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک ارگانسیم آزاد، قادر به ترشح مقادیر زیادی از دو سیدروفور، به طور عمده پیوردین (*pvd*) و به میزان کمتر پیوچلین، به محیط زیست است (۲۰). این سیدروفورها به عنوان انتقال دهنده ای قدرتمند آهن عمل کرده و حمل و نقل آهن از طریق غشاء باکتری و از طریق پروتئین های گیرنده خاصی (*TonB-dependent receptors*) در سطح غشای خارجی بعهده دارند (۲۱ و ۲۲). از ژن های درگیر در تولید پیوردین، *pvdA* و در تولید پیوسیانین، *phzM* است.

در سال ۲۰۰۴ Finnan و همکارانش مقاله ای با عنوان تنوع ژنوم از سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از بیماران مبتلا به فیروز کیستیک و محیط زیست بیمارستان به چاپ رساندند. ژن های بیماری زایی زیادی توسط آنها مورد بررسی قرار گرفت که ژن های *phzM* و *pvdA* نیز در بین آنها وجود داشت. در نتایج مشاهده شد، ۱۴ سویه دارای ژن *phzM* (۸۲/۳۵ درصد) و ۱۳ سویه نیز دارای ژن *pvdA* (۷۶/۴۷ درصد) بودند (۲۳). Holban و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ در مطالعه ای به دنبال شناسایی ژن های ویروالانس مختلف در سودوموناس آئروژینوزای گرفته شده از عفونت های بیمارستانی در بیماران دارای مشکلات قلبی

داروی تجویز شده توسط پزشک، سابقه بستری شدن در بیمارستان در پرسشنامه تنظیمی، ثبت گردید. نمونه برداری از بیماران به صورت استفاده از یک آبسلانگ چوبی برای نمونه برداری از ریه توسط پزشک، یا سواپ سر پنبه ای استریل و کشیدن آن بر سطح زخم و همچنین استفاده از پیت های استریل و ظرف های استریل برای نمونه برداری از خون و ادرار، انجام شد.

در ابتدا هر نمونه بر روی هر دو محیط کشت های EMB، بلاد آگارکشت داده شدند تا گرم منفی بودن آنها تایید شود در ادامه روی آنها رنگ آمیزی گرام هم صورت گرفت. در ادامه پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون بر روی نمونه های باکتریایی رشد یافته و انجام رنگ آمیزی گرام تست های افتراقی شامل کاتالاز، سیترات، تحریک و تولید اندول، متیل رد، VP، TSI، اوره آز و اکسیداز انجام شد (۲۵ - ۲۳).

برای نگهداری سویه ها از محیط LB Luria Bertani (Broth) استفاده شد. پس از تهیه محیط و ریختن ۸۰۰ لاندا از آن ها در ویال های ۱/۵ میکرولیتری به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد در فشار ۱۵ پوند اتوکلاو شدند. سپس چند کلنی خالص از روی محیط جامد برداشته و در شرایط استریل به محیط مزبور تلقیح شده و کاملاً حل شد و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس به ویال هایی که حاوی ۸۰۰ لاندا محیط LB حاوی باکتری رشد یافته، ۲۰۰ لاندا گلیسرول اضافه و مخلوط شد و بعد داخل کرایوتیوب های استریل چند پرل استریل قرار گرفت و پس از چند بار invert کردن مستقیماً در دمای -۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

استخراج و بررسی کمی و کیفی DNA:

جهت تهیه کشت فعال محیط کشت LB که از قبل تهیه شده بود، در دمای محیط قرار داده شد. سپس یک لوپ پر از کلنی باکتری کشت داده شده بر روی نوترینت آگار در مرحله قبل برداشته و داخل محیط مایع LB فرو برده شد و

بودند که فراوانی ژن *pvdA* در نمونه های ادراری، خون، ترشحات ریوی و زخم به ترتیب ۰٪، ۳۰٪، ۰٪ و ۲۵٪ بودند (۲۴).

فاضلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ پروفایل کامل ژن های ویروالانس سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی را در مطالعه ای بررسی کردند. در نتایج آن ها آمده است که ژن های *pvdA* و *phzM* در کل نمونه ها دارای فراوانی به ترتیب برابر با ۳۶/۲۷ درصد و ۲۴/۵ درصد بودند. که شیوع ژن *phzM* بیشتر در نمونه های سوختگی و ژن *pvdA* بیشتر در نمونه های زخم یافت شده است (۲۵).

بنا به آنچه بیان شد هدف از این مطالعه بررسی شیوع ژن های بیماری زای *pvdA* و *phzM* در سودوموناس آئروژینوزا- های جدا شده از بیماران بخش عفونی بیمارستان های کرمانشاه و تعیین ارتباط بین محل عفونت و حضور این ژن ها بود.

روش بررسی

شناسایی و ذخیره سازی ایزوله ها:

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی - تحلیلی است که در فاصله زمانی یکسال از خرداد ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵ صورت گرفت. در این فاصله زمانی ۱۲۳ نمونه ی بالینی (زخم، ادرار، ترشحات ریه و خون) از بیماران مختلف مراجعه کننده به بخش عفونی مراکز درمانی کرمانشاه بعد از گرفتن رضایت نامه از آنها، جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. از میان این ۱۲۳ نمونه ی بالینی تعداد ۱۰۶ سویه ی سودوموناس آئروژینوزا توسط رنگ آمیزی و تست های بیوشیمیایی جداسازی و شناسایی شد. بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی کرمانشاه که بیماری آن ها توسط پزشک مربوطه تایید شد، با رضایت کامل و تکمیل پرسشنامه جهت نمونه برداری آماده شدند. در تمامی موارد داده های مربوط به سن، جنس، نوع نمونه، بیماری تشخیص داده شده توسط پزشک، استفاده بیمار از آنتی بیوتیک،

PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری با استفاده از کیت PCR, PCR PreMIX Acc Power (شرکت BioNEER ساخت کشور کره) انجام شد. PCR در حجم ۲۰ نهایی میکرولیتری با استفاده از کیت PCR, PCR PreMIX Acc Power (شرکت BioNEER ساخت کشور کره) انجام شد. پس از آماده سازی، میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) Mastercycler gradien قرار داده شد. ژن‌های هدف در ترموسایکلر با برنامه ای شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن (Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی گراد، به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال (Annealing) در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه و گسترش (Extention) در ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۵۰ ثانیه، سپس گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در این بررسی از سایز مارکر (bp) ۱۰۰ (Sina Gene, Iran) جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده گردید (۲۳). پس از اتمام واکنش، محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد (شکل‌های ۱و۲).

چند ثانیه در داخل محیط تکان داد شد تا کلنی از لوپ رها شود. سپس محیط LB که باکتری وارد آن شده در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دور rpm ۱۳۰ انکوبه شد. در مراحل بعدی برای استخراج DNA از این کشت استفاده می‌شود. استخراج DNA باکتری توسط کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی (Sina Gene, Iran) بر اساس دستورالعمل مربوط انجام شد. پس از استخراج از هر نمونه ۴ میکرولیتر به همراه ۲ میکرولیتر Loading dye رقیق شده به روی ژل آگارز ۱/۵٪ ران شد و الکتروفورز انجام گرفت. در ادامه جهت اندازه گیری غلظت DNA ۳ μl از نمونه DNA استخراج شده به همراه ۱۹۷ μl آب مقطر (ضریب رقت ۳۳) به کووت دستگاه اضافه شد و میزان جذب نوری آن اندازه گیری شد. با در نظر گرفتن نسبت OD260/OD280=1.8-2 عنوان کیفیت مطلوب DNA برای استفاده در PCR، نمونه‌های مناسب تعیین گردید (۲۳).

واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی *pvdA* و *phzM*:

پرایمرهای طراحی شده و مورد استفاده و سایز قطعات برای هر ژن در جدول ۱ آورده شده است، که برای کلیه DNA های استخراج شده انجام شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده و سایز قطعات برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی

Target	Primer(5' 3')	Product size
<i>pvdA</i>	Forward: GGAGACTTTCTGGCGGTAGA	597 bp
	Reverse: GAGTTCAACGACTACCTGCG	
<i>phzM</i>	Forward: GGATGGCCTTGGTCAATTCG	510 bp
	Reverse: TTACCGGGGAATGGAAGTCC	

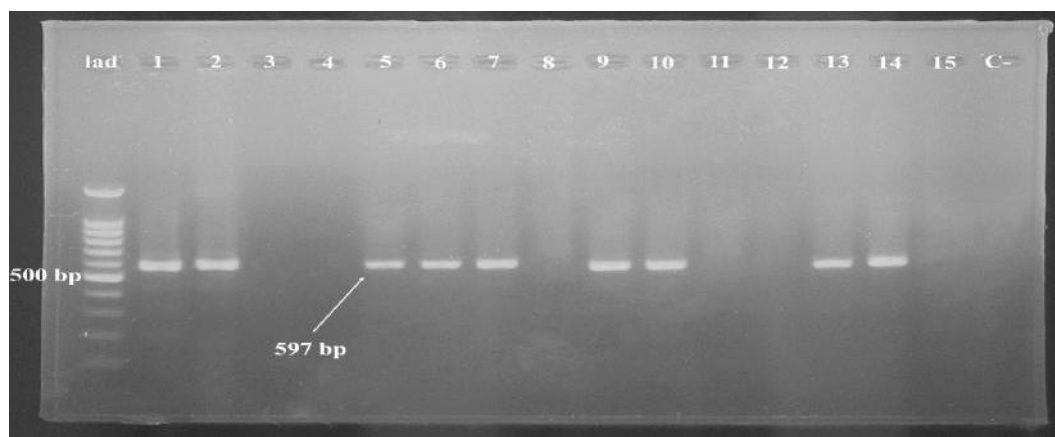
آنالیز آماری:

در نهایت داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS V20 استفاده از آزمون logistic regression تجزیه و تحلیل گردید. همچنین نتایج با فاصله اطمینان ۹۵٪ محاسبه شد و $P < 0/05$ معنی دار تلقی گردید.

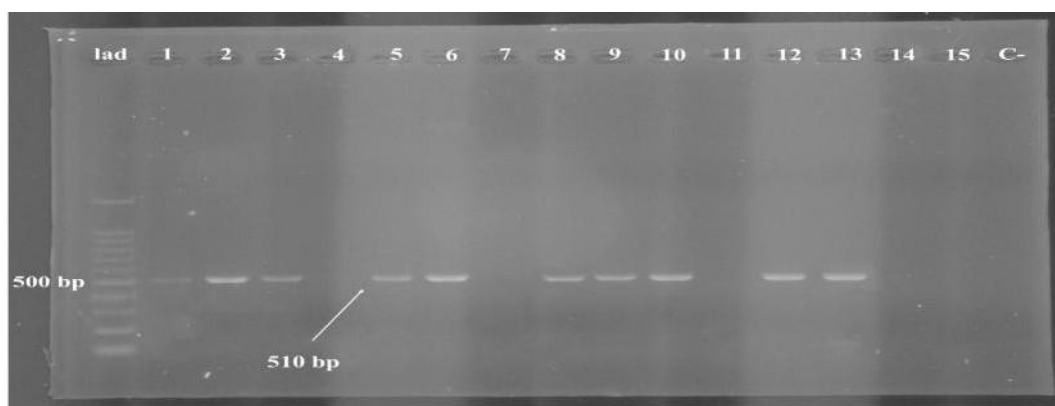
یافته ها

سویه های سودوموناس آئروژینوزا در ۵۱/۸۸ درصد از نمونه های بالینی ادرار، ۱۷/۹۲ درصد نمونه های خون، ۱۴/۱۵ درصد ترشحات زخم و ۱۶/۰۵ درصد از ترشحات ریه جداسازی شدند. پس از انجام PCR دیده شد که در میان ۱۰۶ سویه مورد مطالعه ۳۴ سویه دارای ژن *pvdA* و ۴۷ سویه دارای ژن *phzM* و ۲۵ نمونه حاوی هر دو ژن بودند. در شکل ۱ و ۲ تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن *pvdA* و *phzM* آورده شده است. همچنین نتایج نشان داد، بیشترین میزان حضور ژن *phzM* در نمونه های ادراری و میزان آن برابر با ۵۵/۳۱ درصد بود. بعد از آن نمونه های خون و سپس ترشحات ریه و در آخر نمونه های زخمی به ترتیب با فراوانی های ۱۹/۱۴٪، ۱۴/۸۹٪ و ۱۰/۶۳٪ دارای ژن *phzM* بودند. بعلاوه مشاهده شد که ژن *pvdA* در نمونه های خونی بیشترین درصد حضور (۳۵/۲۹ درصد)، در نمونه های ادرار کمترین درصد حضور (۵/۵۸٪) و در نمونه های بالینی ترشحات ریه و زخم شیوع برابر به میزان ۲۹/۴۱٪ را دارا است. نتایج آنالیز آماری رگرسیون لجستیک بر اساس نوع نمونه بالینی باکتری ها و حضور ژن *pvdA* و *phzM* در جدول ۲ آورده شده است.

در این آنالیز دیده شد که بین حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از ادرار $P < 0/001$ ، خون با P برابر با ۰/۰۰۲، زخم با P برابر با ۰/۰۰۴ و ترشحات ریه با P برابر با ۰/۰۱۳ ارتباط معنی داری وجود دارد. همچنین بین حضور ژن *phzM* و نمونه های گرفته شده رابطه ای یافت نشد. محاسبه ی نسبت شانس یا همان OR برای رابطه ی حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از ادرار برابر با ۰/۰۲۲ بود (پایین تر از ۱) عبارتی سویه هایی که از ادرار جدا شده اند به احتمال خیلی پایینی دارای ژن *pvdA* هستند. نسبت شانس برای رابطه ی حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از خون برابر با ۵/۰۶۵ بود (بالتر از ۱) یعنی، سویه هایی که از خون جدا شده اند ۵/۰۶۵ برابر بیشتر احتمال داشتن ژن *pvdA* را دارند. نسبت شانس برای رابطه ی حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از زخم برابر با ۵/۵۸۳ بود (بالتر از ۱) عبارتی سویه هایی که از زخم جدا شده اند ۵/۵۸۳ برابر بیشتر احتمال داشتن ژن *pvdA* را دارند. نسبت شانس برای رابطه ی حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از ریه برابر با ۳/۸۶۹ بود (بالتر از ۱)، عبارتی سویه هایی که از ریه جدا می شوند ۳/۸۶۹ برابر بیشتر احتمال داشتن ژن *pvdA* را دارند.



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن *pvda*



شکل ۲. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن *phzM*

جدول ۲. آنالیز آماری تعیین رابطه‌ی محل عفونت با حضور ژن‌های مورد بررسی

ژن ها	مکان عفونت	P	Exp(B)	CI (۹۵%) for EXP(B)	
				پایین ترین	بالا ترین
<i>pvda</i>	ادرار	<۰/۰۰۱	۰/۰۲۲	۰/۰۰۵	۰/۱۰۳
	خون	۰/۰۰۲	۵/۰۶۵	۱/۷۷۲	۱۴/۴۷۵
	زخم	۰/۰۰۴	۵/۵۸۳	۱/۷۳۲	۱۷/۹۹۷
	ترشحات ریه	۰/۰۱۳	۳/۸۶۹	۱/۳۲۳	۱۱/۳۱۸
<i>phzM</i>	ادرار	۰/۵۲۸	۱/۲۸۱	۰/۵۹۴	۲/۷۶۳
	خون	۰/۷۶۹	۱/۱۶۱	۰/۴۲۹	۳/۱۴۰
	زخم	۰/۳۵۸	۰/۵۸۳	۰/۱۸۵	۱/۸۴۲
	ترشحات ریه	۰/۷۷۵	۰/۸۵۸	۰/۲۹۹	۲/۴۵۶

p value :sig.

Exp(B)- نسبت شانسی یا OR، بدست آمده برای نمونه‌ها بر اساس منشا کسب نمونه

بحث

۱۰۶ سویه سودوموناس آئروژینوزا وارد این مطالعه شد که ۵۱/۸۸ درصد از نمونه‌ی بالینی ادرار، ۱۷/۹۲ درصد از خون، ۱۴/۱۵ درصد از ترشحات زخم و ۱۶/۰۳ درصد از ریه جداسازی و شناسایی شدند. در میان این ۱۰۶ سویه ۳۴ سویه (۳۲/۰۷ درصد) دارای ژن *pvdA* (تولید کننده‌ی پیووردین) بودند. همچنین ۴۷ سویه ۴۴/۳۳ درصد دارای ژن *phzM* (تولید کننده‌ی پیوسیاین) بودند. در کل ۱۷ سویه (۱۶/۰۳ درصد) به صورت همزمان دارای این دو ژن بودند. توسط آنالیز رگرسیون لجستیک ارتباط بین حضور ژن‌ها و محل عفونت بررسی گردید. در نتایج این مطالعه دیده شد که بین نمونه‌های خون، زخم و ریه و حضور سیدروفور پیووردین در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا رابطه‌ی معنی‌دار با OR بالای یک وجود دارد. هنگامی که آهن از روده کوچک جذب می‌شود بلافاصله در پلاسمای خون با یک بتا گلوبولین موسوم به آپوترانسفرین ترکیب شده و ترانسفرین را تشکیل می‌دهد و سپس در پلاسمای خون انتقال می‌یابد. آهن به صورت بسیار سستی با مولکول گلوبولین ترکیب شده و در نتیجه می‌تواند در هر نقطه از بدن به هر یک از بافت‌ها آزاد شود. مازاد آهن خون در تمام سلول‌های بدن بخصوص در سلول‌های کبدی و به مقدار کمتر در سلول‌های رتیکوآندوتلیال مغز استخوان رسوب می‌کند. آهن در سیتوپلاسم سلول با پروتئینی به نام آپوفرتین ترکیب شده و فرتین را تشکیل می‌دهد (۲۲). بنابراین مقدار آهن آزاد در بسیاری از بافت‌ها بسیار پایین است و اکثراً به صورت ترکیبی وجود دارند. لذا، سویه‌هایی که از خون جدا شده‌اند باید دارای سیدروفورهایی برای جذب بهینه‌ی آهن‌های آزاد خون باشند، که یکی از آن‌ها پیووردین در

سودوموناس آئروژینوزا است. هرچند این را نباید نادیده گرفت که در حالت عادی خون فاقد هر گونه میکروب است، مگر اینکه فرد دچار سپتی سمی شده باشد و میکروب وارد خون شده باشد، در این حالت نیز باکتری از عفونت‌های مختلف در نقاط مختلف بدن می‌تواند به خون راه پیدا کرده باشد. بنابراین سویه‌هایی که از خون جدا شده‌اند می‌توانند مربوط به هر بافت دیگر مانند روده باشند. در زخم نیز مقدار آهن پایین است و بدیهی است که OR برای این نمونه‌ها نیز احتمالاً بالای ۱ می‌باشد (۲۲). ریه نیز مانند بافت‌های دیگر دارای مقدار کمی آهن است. در مطالعاتی دیده شده هنگامی که سودوموناس به ریه‌ها حمله می‌کند، قادر به تولید پیووردین می‌باشد، اما هرچه کلنی‌اسیون باکتری در ریه پیشرفت می‌کند دیگر تولید پیووردین کاهش می‌یابد و باکتری پاسخ التهابی قوی داشته و به تولید پیوچلین می‌پردازد که منجر به آسیب بافتی و رها شدن محتویات سلولی شامل هموپروتئین‌ها و دیگر پروتئین‌های حاوی آهن می‌شود. سیدروفورها از جمله پیووردین، در نمونه خلط از بیماران CF تشخیص داده شده است. (۲۲). بنابراین وجود رابطه‌ی معنی‌دار مستقیم بین حضور ژن تولید کننده‌ی پیووردین و عفونت در ریه‌ها، منطقی است.

در سال ۲۰۰۴ Finnan تنوع ژنوم سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از بیماران مبتلا به فیروز کیستیک را بررسی کرد. ۱۴ سویه دارای ژن *phzM* بودند که برابر با ۸۲/۳۵ درصد است. همچنین ۱۳ سویه نیز دارای ژن *pvdA* بودند که برابر با ۷۶/۴۷ درصد است (۲۳). HOLBAN و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای به دنبال شناسایی ژن‌های ویروالانس مختلف در سودوموناس آئروژینوزای گرفته شده از عفونت‌های بیمارستانی در بیماران

یافت نشد. تفاوت در منطقه‌ی جغرافیایی اصلی‌ترین دلیل این تفاوت در چنین مطالعاتی محسوب می‌شود. دلیل دیگر نیز می‌تواند تفاوت در نوع سویه باشد که آن‌ها از سویه‌های محیطی نیز در مطالعه‌ی خود استفاده کرده‌اند و همچنین اینکه آن‌ها از تعداد سویه‌های کم استفاده کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

با بررسی شیوع ژن‌های ویروالانس در سویه‌های بیماری‌زایی در نقاط مختلف جهان می‌توان به الگوی پراکندگی این ژن‌ها دست یافت که در شناخت بهتر نحوه‌ی بیماری‌زایی و نقش این ژن‌ها در بیماری‌زایی سویه‌ها کمک فراوان می‌کند. با شناخت بهتر بیماری‌زایی و نقش این ژن‌ها پزشکان می‌توانند مسیر درمان را به بهترین صورت انتخاب کنند. ژن‌های *pvdA* و *phzM* در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای کرمانشاه تقریباً شیوع متوسطی دارد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر نتیجه پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات سنندج است. نویسندگان این مقاله از همکاری صمیمانه مدیریت بیمارستان‌های امام خمینی و امام علی کرمانشاه و پرسنل آزمایشگاه تشکر و قدردانی دارند.

Reference

1. Streeter K, Katouli M. Pseudomonas aeruginosa: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infect Epidemiol Med* 2016;2:25-32.
2. Pereira S, Rosa A, Ferreira A, Moreira L, Proença D, Morais P, et al. Virulence factors and infection ability of Pseudomonas aeruginosa isolates from a hydropathic facility and respiratory infections. *J Appl Microbiol* 2014;116:1359-68.
3. Fricks-Lima J, Hendrickson C, Allgaier M, Zhuo H, Wiener-Kronish J, Lynch S, et al. Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:309-15.

دارای مشکلات قلبی بودند. در میان ژن‌های زیادی که آن‌ها شناسایی کردند فراوانی ژن *pvdA* در نمونه‌های ادراری، خون، ترشحات ریوی و زخم به ترتیب ۰٪، ۳۰٪، ۰٪ و ۲۵٪ بود (۲۴). فاضلی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ پروفایل کامل ژن‌های ویروالانس سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی را در مطالعه‌ای بررسی کردند. فراوانی ژن‌های *phzM* و *pvdA* در نمونه‌ها به ترتیب ۳۶/۲۷ درصد و ۲۴/۵ درصد بود. ژن *phzM* بیشتر در نمونه‌های سوختگی و ژن *pvdA* بیشتر در نمونه‌های زخم یافت شد (۲۵). با مقایسه نتایج مطالعه‌ی آن‌ها با مطالعه‌ی حاضر می‌توان دید که اختلاف‌های و شباهت‌هایی وجود دارد. به عنوان مثال آن‌ها در ادرار سویه‌ای که دارای ژن *pvdA* باشد، یافت نکرده‌اند و همانطور که گفته شد در مطالعه‌ی حاضر نیز رابطه‌ی بین حضور ژن *pvdA* و ادرار را به صورت معکوس گزارش شده است (OR=۰/۰۲۲). نتایج حضور ژن *pvdA* در خون هماهنگ است. نتایج آن‌ها برای زخم نیز تقریباً مشابه مطالعه حاضر بود. اما تفاوت در این دو مطالعه در نتایج به دست آمده در رابطه با سویه‌های ریوی بود. دلیل این تفاوت را می‌توان در این دید که شاید سویه‌های مطالعه‌ی آن‌ها دارای مکانیسم‌های دیگر جذب آهن بوده‌اند. ژن *phzM* دارای پراکندگی یکسان در محل‌های عفونت مختلف بود به همین دلیل رابطه‌ی معنی‌داری بین محل عفونت و حضور این ژن

4. Sibila O, Laserna E, Maselli DJ, Fernandez JF, Mortensen EM, Anzueto A, et al. Risk factors and antibiotic therapy in *P. aeruginosa* community-acquired pneumonia. *Respirology* 2015;20:660-66.
5. Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:61-6.
6. Stover C, Pham X, Erwin A, Mizoguchi S, Warren P, Hickey M, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959-64.
7. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 2013;67:159-73.
8. Vandelden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998;4:551-60.
9. Omalley, YQ, Reszka KJ, Britigan BE. Direct oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by pyocyanin and other redox-active compounds independent of reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 2004;36:90-100.
10. Hall, S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, McFarland AJ, Forbes A, Perkins AV, et al. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* 2016;8:236.
11. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* 2004;72:4275-8.
12. McDermott C, Chess-Williams R, Mills KA, Kang SH, Farr S, Grant GD, et al. Alterations in acetylcholine, PGE 2 and IL6 release from urothelial cells following treatment with pyocyanin and lipopolysaccharide. *Toxicol In Vitro* 2013;27:1693-8.
13. Britigan BE, Roeder TL, Rasmussen GT, Shasby DM, McCormick ML, Cox CD. Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. *Eur J Clin Invest* 1992;90:2187-96.
14. McDermott C, Chess-Williams R, Grant GD, Perkins AV, McFarland AJ, Davey AK, et al. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin on human urothelial cell function and viability. *J Urol* 2012;187:1087-93.
15. Hempenstall A, Grant GD, Anoopkumar-Dukie S, Johnson PJ. Pyocyanin inhibits both nitric oxide-dependent and-independent relaxation in porcine coronary arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015;42:186-91.
16. Cheluvappa R, Jamieson HA, Hilmer SN, Muller M, Le Couteur DG. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor, pyocyanin, on the liver sinusoidal endothelial cell. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1350-1.
17. Cheluvappa R, Cogger VC, Kwun SY, O'Reilly JN, LeCouteur DG, Hilmer SN. Liver sinusoidal endothelial cells and acute non-oxidative hepatic injury induced by *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Int J Clin Exp Pathol* 2008;89:410-8.
18. McFarland AJ, Grant GD, Perkins AV, Flegg C, Davey AK, Allsopp TJ, et al. Paradoxical role of 3-methyladenine in pyocyanin-induced toxicity in 1321N1 astrocytoma and SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Toxicol* 2013;32:209-18.
19. Krämer A, Herzer J, Overhage J, Meyer-Almes FJ. Substrate specificity and function of acetylpolyamine amidohydrolases from *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Biochem* 2016;17:4.
20. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1996;64:518-23.

21. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:75.
22. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 2008;88:7-15.
23. Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol* 2004;42:5783-92.
24. Holban AM, Chifiriuc MC, Cotar AI, Bleotu C, Grumezescu AM, Banu O, et al. Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital-acquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. *Rom Biotechnol Lett* 2013;18:8843-54.
25. Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iranian Hospital Infections. *Iran Red Crescent Med J* 2014;16:1-10.