

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 *pvdA* و *phzM* در سودوموناس آئروژینوزاها جدا شده از بیماران بخش عفونی

الله جاویدزاد، فاطمه کشاورزی*

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد سنتدج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنتدج، ایران.
۲. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، واحد سنتدج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنتدج، ایران (مؤلف مسؤول)، تلفن ثابت: ۰۷۳۲۸۷۶۵۲، f.keshavarzi@iausdj.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: باکتری سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی و سپتی سمی در بیماران بخش سوختگی و افراد مبتلا به بیماری سیستیک فیبروزیس است که در آب و خاک مرطوب نیز یافت می گردد. از ژن‌های بیماری‌زای در گیر در تولید دو ناقل آهن در باکتری یعنی پیووردین و پیوسیاتین، *phzM* و *pvdA* می باشد. 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 آئروژینوزاها جدا شده از بیماران عفونت یافته می باشد.

روش بررسی: نمونه‌های بالینی از افراد بیماری که به بیمارستان‌های کرمانشاه مراجعه کردند، گرفته شد. پس از جداسازی و شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا استخراج DNA با کیت سینثاز 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 (۴۴/۳۳ درصد) و ۴۷ سویه (۴۷/۰۷ درصد) بترتیب برای ژن‌های *pvdA* و *phzM* مثبت بودند. آنالیز رگرسیون لجستیک نشان داد که بین حضور ژن *pvdA* و نمونه‌های گرفته شده از ادرار با P برابر با $0/001$ ، خون با P برابر با $0/002$ ، زخم با P برابر با $0/004$ و ریه با P برابر با $0/013$ ارتباط معنی داری وجود دارد. بعلاوه، بین حضور ژن *phzM* و نمونه‌های گرفته شده کلا هیچ رابطه‌ای یافت نشد.

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

واژه‌ای کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، ژن‌های بیماری‌زایی، *pvdA*، *phzM*

وصول مقاله: ۹۵/۲۵ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۶/۲۷ پذیرش: ۹۶/۷/۲

مقدمه

است(۱۳-۱۱). این نتایج 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 رادیکالهای آزاد و اثرات التهابی است که منجر به آسیب و مرگ سلولی می شود(۱۳-۱۱). تا کنون بیشترین مطالعات در باره‌ی بررسی اثرات پیوسیانین بر مجاری هوایی انسان بوده است. اخیرا در چندین مطالعه به بررسی اثرات پیوسیانین بر اندام‌های دیگر به خصوص مجاری ادراری (۱۴ و ۱۲)، سیستم قلبی عروقی (۱۵)، سیستم کبدی (۱۷ و ۱۶) و سیستم عصبی مرکزی (۱۸) پرداخته اند.

سودومonas آئروژینوزا/ به عنوان یک باکتری هوایی(۱۹)، نیاز زیادی به آهن دارد. سودومonas آئروژینوزا/ به عنوان یک ارگانیسم آزاد، قادر به ترشح مقادیر زیادی از دو سیدروفور، به طور عمد پیووردین(*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 بعده دارند(۲۱ و ۲۲). از ژن های در گیر *pvdA* در تولید پیووردین، *pvdA* و در تولید پیوسیانین، *phzM* است.

در سال ۲۰۰۴ و همکارانش مقاله‌ای با عنوان تنواع ژنوم از سودومonas آئروژینوزاهای جدا شده از بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک و محیط زیست بیمارستان به چاپ رساندند. ژن های بیماری‌زاوی 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 *pvdA* (۸۲/۳۵ درصد) و ۱۳ سویه نیز دارای ژن *phzM* (۷۶/۴۷ درصد) بودند (۲۳). Holban و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای به دنبال شناسایی ژن های ویرولانس مختلف در سودومonas آئروژینوزای گرفته شده از عفونت های بیمارستانی در بیماران دارای مشکلات قلبی

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

برخی فاکتورهای ویرولانس در این باکتری احتمالاً 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 ویرولانس به همراه سلول و فاکتورهای خارج سلولی شامل آژینات، اگزو توکسین ها، الاستاز، پروتاز و پروتئین های سیستم ترشحی تیپ ۳ را کد می کند(۶). برخی از فاکتورهای ویرولانس نیز برای بیماری زاوی این باکتری ضروری هستند(۷). بیماری زاوی سودومonas آئروژینوزا مربوط به چندین فاکتور بیماری زاوی وابسته و خارج سلولی است که می تواند طیف وسیعی از عفونت های شدید را ایجاد کند. فاکتورهای وابسته به سلول شامل تاژک، پیلی، لیپوبلی ساکارید، آژینات/ بیوفیلم، ادھزین های غیرپیلوس و فاکتورهای خارج سلولی مهم پروتازها، همولیزین، اگزو توکسین A، اگزو آنزیم 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 زاوی سودومonas و توانایی سمی بودن پیوسیانین نشان داده

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 سوپ سر پنه ای استریل و کشیدن آن بر سطح زخم و همچنین استفاده از پیپت 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 آگار کشت 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 افتراکی شامل کاتالاز، سیترات، تحریک و تولید اندول، متیل رد، TSI، اوره آز و اکسیداز انجام شد (۲۵-۲۳). برای نگهداری سویه ها از محیط LB Bertani Broth (Broth) استفاده شد. پس از تهیه محیط و ریختن ۸۰۰ لاندا از آنها 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 کاملا 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 invert چند پرل استریل قرار گرفت و پس از چند بار کردن مستقیما در دمای -۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

استخراج و بررسی کمی و کیفی DNA:
جهت تهیی کشت فعال محیط کشت LB که از قبل تهیی شده بود، در دمای محیط قرار داده شد. سپس یک لوب 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٪ ۳۰،٪ ۳۰ و٪ ۲۵ بودند (۲۴).

فاصلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ بروفایل کامل ژن-های ویرولانس سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی را در مطالعه ای بررسی کردند. در نتایج آنها 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).

بنابرآنچه 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 بالینی (زخم، ادرار، ترشحات ریه و خون) از بیماران مختلف مراجعه کننده به بخش عفونی مرکز درمانی کرمانشاه بعد از گرفتن رضایت نامه از آنها، جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. از میان این ۱۲۳ نمونه یالینی تعداد ۱۰۶ سویه سودوموناس آئروژینوزا توسط رنگ آمیزی و تست های بیوشیمیابی 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 Acc Power PCR PreMIX, PCR ساخت کشور کره (شرکت BioNEER) انجام شد. PCR در حجم نهایی میکرولیتری با استفاده از کیت Acc Power PCR PreMIX (شرکت BioNEER) ساخت کشور کره (Eppendorf) Mastercycler gradien قرار داده شد. ژن های هدف در ترموسایکلر دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) Mastercycler به مدت ۴ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت گراد به مدت ۹۵ درجه سانتی گراد، به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال (Annealing) در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد بدمت ۵۰ ثانیه، سپس گسترش (Extention) در درجه سانتی گراد بدمت ۳۰ ثانیه و گسترش (Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. پس از آماده سازی، میکروتیوب ها در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) Mastercycler برای این کش استخراج DNA باکتری های گرم منفی (Sina Gene, Iran) بر اساس دستور العمل 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 μg از نمونه DNA استخراج شده به همراه $1\text{ }\mu\text{l}$ آب مقطر (ضریب رقت ۳۳) به کووت دستگاه اضافه شد و میزان جذب نوری آن اندازه گیری شد. با در نظر گرفتن نسبت $\text{OD}260/\text{OD}280=1.8-2$ عنوان کیفیت مطلوب DNA برای استفاده در PCR، نمونه های مناسب تعیین گردید (۲۳).

واکنش PCR برای شناسایی ژن های بیماری زایی *pvdA*:
phzM پرایمر های 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. پرایمر های مورد استفاده و سایز قطعات برای شناسایی ژن های بیماری زایی

Target	Primer(5' - 3')	Product size
<i>pvdA</i>	Forward: GGAGACTTCTGGCGGTAGA	597 bp
	Reverse: GAGTTAACGACTACCTGCG	
<i>phzM</i>	Forward: GGATGGCCTGGTCAATTG	510 bp
	Reverse: TTACCGGGGAATGGAAGTCC	

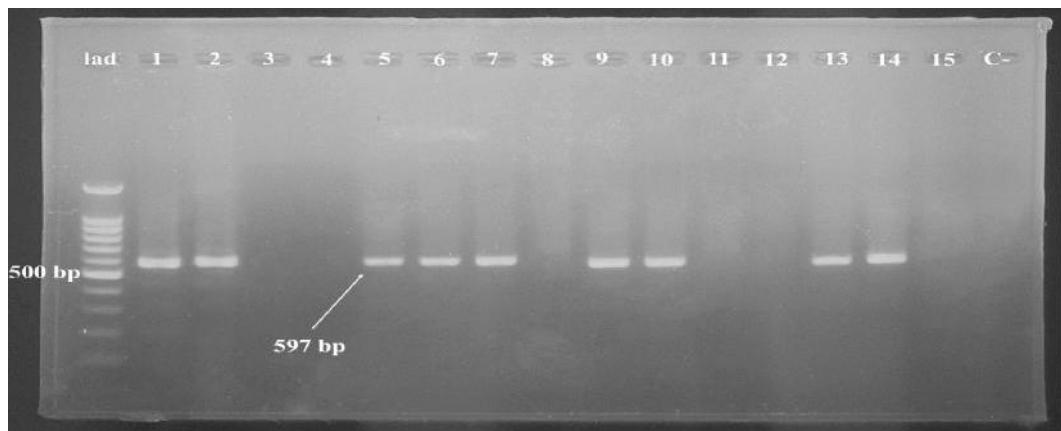
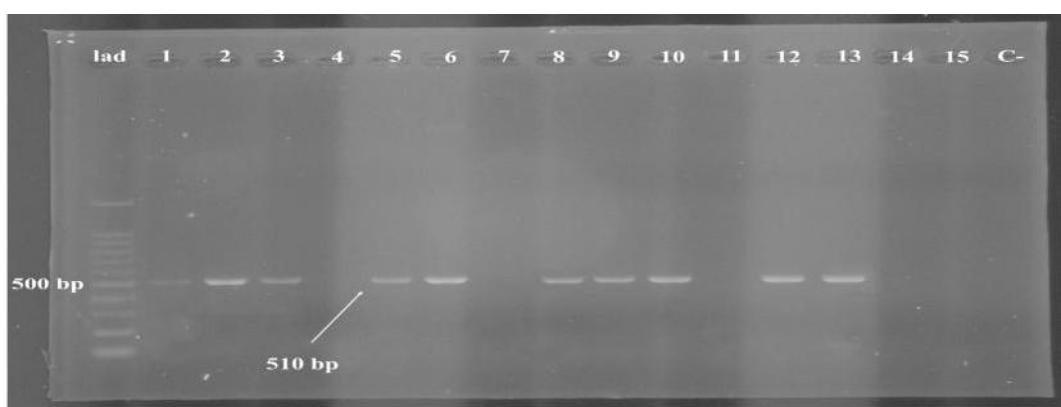
در این آنالیز دیده شد که بین حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از ادرار <0.001 ، خون با p برابر با 0.002 ، زخم با p برابر با 0.004 و ترشحات ریه با p برابر با 0.013 ارتباط معنی داری وجود دارد. همچنین بین حضور ژن *phzM* و نمونه های گرفته شده رابطه ای یافت نشد. محاسبه ای نسبت شانس یا همان OR برای رابطه ای حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از ادرار برابر با 0.022 بود(پایین تر از ۱) بعارتی سویه هایی که از ادرار جدا شده اند به احتمال خیلی پایینی دارای ژن *pvdA* هستند. نسبت شانس برای رابطه ای حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از خون برابر با 0.065 بود(بالاتر از ۱) یعنی، سویه هایی که از خون جدا شده اند 0.065 برابر بیشتر احتمال داشتن ژن *pvdA* را دارند. نسبت شانس برای رابطه ای حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از زخم برابر با 0.0583 بود (بالاتر از ۱) بعارتی سویه هایی که از زخم جدا شده اند 0.0583 برابر بیشتر احتمال داشتن ژن *pvdA* را دارند. نسبت شانس برای رابطه ای حضور ژن *pvdA* و نمونه های گرفته شده از ریه برابر با 0.03869 بود (بالاتر از ۱)، بعارتی سویه هایی که از ریه جدا می شوند 0.03869 برابر بیشتر احتمال داشتن ژن *pvdA* را دارند.

آنالیز آماری:

در نهایت داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS V20 با 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 $55/31$ درصد بود. بعد از آن نمونه های خون و سپس ترشحات ریه و در آخر نمونه های زخمی به ترتیب با فراوانی های $19/14$ ٪، $14/89$ ٪ و $10/63$ ٪ دارای ژن *phzM* بودند. بعلاوه مشاهده شد که ژن *pvdA* در نمونه های خونی بیشترین درصد حضور $25/29$ درصد، در نمونه های ادرار کمترین درصد حضور $0.5/58$ ٪ و در نمونه های بالینی ترشحات ریه و زخم شیوع برابر به میزان $29/41$ ٪ را دارا است. نتایج آنالیز آماری رگرسیون لجستیک بر اساس نوع نمونه بالینی باکتری ها و حضور ژن *phzM* و *pvdA* در جدول ۲ آورده شده است.

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	بالاترین
<i>pvdA</i>	ادرار	<0.001	0/022	0/005	0/103
	خون	0/002	5/065	1/772	14/475
	زخم	0/004	5/583	1/732	17/997
	ترشحات ریه	0/013	3/869	1/323	11/318
<i>phzM</i>	ادرار	0/528	1/281	0/594	2/763
	خون	0/769	1/161	0/429	3/140
	زخم	0/358	0/583	0/185	1/842
	ترشحات ریه	0/775	0/858	0/299	2/456

p value .sig.

: نسبت شانس یا OR، بدست آمده برای نمونه‌ها بر اساس منشا کسب نمونه

بحث

سودومonas 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 عفونت های مختلف در نقاط مختلف بدن می تواند به خون راه پیدا کرده باشد. بنابراین سویه هایی که از خون جدا شده اند می توانند مربوط به هر بافت دیگر مانند روده باشند. در زخم نیز مقدار آهن پایین است و بدیهی است که OR برای این نمونه ها نیز احتمالاً بالای ۱ می باشد (۲۲). ریه نیز مانند بافت های دیگر دارای مقدار کمی آهن است. در مطالعاتی دیده شده هنگامی که سودومonas به ریه ها حمله می کند، قادر به تولید پیووردین می باشد، اما هرچه کلینیزاسیون باکتری در ریه پیشرفت می کند دیگر تولید پیووردین کاهش می یابد و باکتری پاسخ التهابی قوی داشته و به تولید پیوچلین می پردازد که منجر به آسیب بافتی و رها شدن محاویات سلولی شامل هموپروتئین ها و دیگر پروتئین های حاوی آهن می شود. سیدروفورها از جمله پیووردین، در نمونه خلط از بیماران CF تشخیص داده شده است. (۲۲). بنابراین وجود رابطه ای معنی دار مستقیم بین حضور ژن تولید کننده پیووردین و عفونت در ریه ها، منطقی است.

در سال ۲۰۰۴ Finnane تنوع ژنوم سودومonas آئروژینوزاهای جدا شده از بیماران مبتلا به فیروز *phzM* 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 مطالعه ای به دنبال شناسایی ژن های ویرولاس مختلف در سودومonas آئروژینوزای گرفته شده از عفونت های بیمارستانی در بیماران

۱۰۶ سویه سودومonas آئروژینوزا وارد این مطالعه شد که ۵۱/۸۸ درصد از نمونه های 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 کننده پیووردین) بودند. همچنین ۴۷ سویه (۴۴/۳۳ درصد دارای ژن *phzM* (تولید کننده پیوسرایین) بودند. در کل ۱۷ سویه (۱۶/۰۳ درصد) به صورت همزمان دارای این دو ژن بودند. توسط آنالیز رگرسیون لجستیک ارتباط بین حضور ژن ها و محل عفونت بررسی گردید. در نتایج این مطالعه دیده شد که بین نمونه های خون، زخم و ریه و حضور سیدروفور پیووردین در سویه های سودومonas آئروژینوزا رابطه ای معنی دار با OR بالای یک وجود دارد. هنگامی که آهن از روده کوچک جذب می شود بلا فاصله در پلاسمای خون با یک بتا گلوبولین موسوم به آپوترانسفرین ترکیب شده و ترانسفرین را تشکیل می دهد و سپس در پلاسمای خون انتقال می یابد. آهن به صورت بسیار سستی با مولکول گلوبولین ترکیب شده و در نتیجه می تواند در هر نقطه از بدن به هر یک از بافت ها آزاد شود. مازاد آهن خون در تمام سلول های بدن بخصوص در سلول های کبدی و به مقدار کمتر در سلول های رتیکو آندوتیال مغز استخوان رسوب می کند. آهن در سیتوپلاسم سلول با پروتئینی به نام آپوفریتین ترکیب شده و فریتین را تشکیل می دهد (۲۲). بنابراین مقدار آهن آزاد در بسیاری از بافت ها بسیار پایین است و اکثرا به صورت ترکیبی وجود دارد. لذا، سویه هایی که از خون جدا شده اند باید دارای سیدروفورهایی برای جذب بهینه های آهن های آزاد خون باشند، که یکی از آن ها پیووردین در

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 کردنده‌اند.

نتیجه گیری

با بررسی شیوع ژن‌های ویرولانس در سویه‌های بیماری‌زاوی در نقاط مختلف جهان می‌توان به الگوی پراکندگی این ژن‌ها دست یافت که در شناخت بهتر نحوه بیماری‌زاوی و نقش این ژن‌ها در بیماری‌زاوی سویه‌ها کمک فراوان می‌کند. با شناخت بهتر بیماری‌زاوی و نقش این ژن‌ها پژوهشکان می‌توانند مسیر درمان را به بهترین صورت انتخاب کنند. ژن‌های آئروژینوزای کرمنشاه تقریباً شیوع متوسطی دارد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر نتیجه پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات سنترج ا است. نویسنده‌گان این مقاله از همکاری صمیمانه مدیریت بیمارستان‌های امام خمینی و امام علی کرمنشاه 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, Proen  a 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 30% ، 30% و 25% بود(۲۴). فاضلی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ پروفایل کامل ژن‌های ویرولانس سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی را در مطالعه‌ای بررسی کردند. فراوانی ژن‌های *phzM* و *pvdA* در نمونه‌ها به ترتیب $36/27$ درصد و $24/5$ 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 ($OR=0.22$). 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, Warrener 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. Vandelen C, Iglesias 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. Pyoverdin 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 Biotehnol 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.