● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۲، ص ۱۴۳-۱۳۳، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

گروه‌بندی سرولوژیک و مقایسه هیدروفوبیسیتی سطحی، تولید بیوفیلم و پروتئازها در ایزوله‌های بالینی و محیطی سودوموناس آئروژینوزا

هادی لطفی[1]، شهلا منصوری[2*]

خلاصه

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت‌طلب و عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است. عوامل متعددی در بیماری‌زایی این باکتری نقش دارد. این بررسی با هدف مقایسه برخی شاخص‌های مرتبط با بیماری‌زایی در ایزوله‌های محیطی با ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.

روش: بررسی بر روی ۲۵ ایزوله محیطی (خاک و آب) و ۱۰۰ باکتری جدا شده از نمونه‌های بالینی (خون، ادرار، زخم، سوختگی و مایعات مختلف) صورت گرفت و سروتایپینگ با آنتی‌سرم‌های پلی‌والانت و مونووالانت بررسی شد. هیدروفوبیسیتی سطحی (Cell surface hydrophobicity یا CSH) با روش اتصال به هیدروکربن و تولید بیوفیلم به روش رنگ‌آمیزی با کریستال ویولت انجام شد. اندازه‌گیری پروتئاز Las A و الاستاز Las B به ترتیب با Congo red و محلول جوشانده شده استافیلوکوک اورئوس به عنوان سوبسترا صورت گرفت. ژن Las R توسط روش PCR (Polymerase chain reaction) بررسی گردید.

یافته‌ها: بیشترین سروتایپ بین نمونه‌های مورد بررسی سروتایپ B بود (۲۳/۵۲ درصد در نمونه‌های بالینی و ۱۲ درصد در نمونه‌های محیطی). در ایزوله‌های بالینی، سروتایپ B و در نمونه‌های محیطی سروتایپ J بیشترین فراوانی را داشت. سروتایپ مزبور در نمونه‌های بالینی مشاهده نشد. میانگین تولید بیوفیلم، CSH و فعالیت آنزیم‌های Las A و Las B در نمونه‌های بالینی بیشتر از ایزوله‌های محیطی بود و در مورد Las A اختلاف معنی‌داری به دست آمد (P = ۰/۰۱۰). ژن LAS R در تمام ایزوله‌های بالینی و محیطی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: اختلاف در فراوانی سروتایپ‌ها و فراوانی بیشتر Las A در نمونه‌های بالینی از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به نبود اختلاف آماری در رابطه با سایر شاخص‌های بیماری‌زا در دو گروه، به نظر می‌رسد که بیان ژن‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل محیطی باشد. مطالعه با تعداد بیشتر نمونه و بررسی بیان ژن‌های ویرولانس برای تأیید مطالعه حاضر لازم است.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، شاخص‌های ویرولانس، نمونه‌های بالینی، نمونه‌های محیطی

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۲- استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

* **نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** smansouri@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۶ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۳/۲۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۳/۳/۲۸

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیلی گرم منفی، هوازی اجباری و دارای یکی از بزرگ‌ترین ژنوم‌ها در میان پروکریوتیک‌ها است، بنابراین قادر به رشد در محیط‌های مختلف و با حداقل مواد غذایی می‌باشد (۱). این باکتری فرصت‌طلب و عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به خصوص در بیماران با شرایط خاص مانند افراد دچار سوختگی، مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و نواقص متابولیک مانند دیابت و یا فیبروز سیستیک می‌باشد. سودوموناس آئروژینوزا عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی (Nosocomial infection) است و به علت نفوذپذیری محدود غشا و داشتن پمپ‌های مختلف تراوشی، به طور ذاتی و یا اکتسابی به بسیاری از داروهای ضد میکروبی مقاوم شده و درمان عفونت‌های این باکتری بسیار مشکل است (۲). این ارگانیزم دارای شاخص‌های ویرولانس (Virulence) متعددی مانند پیووردین، پیوسیانین، پروتئازها، آلژینات، پیلی و تولید بیوفیلم می‌باشد که تحت تأثیر سیستم درک حد نصاب (Quorum sensing یا QS) هستند (۲). از پروتئازهای این باکتری می‌توان آنزیم الاستاز Las B و آنزیم پروتئاز Las A را نام برد. پروتئازها با دخالت در مکانیسم‌های دفاعی میزبان موجب تخریب سدهای دفاع فیزیکی می‌شوند (۳).

در مطالعات متعدد گزارش شده است که تولید برخی از شاخص‌های ویرولانس در باکتری‌های مقاوم به دارو کمتر از ایزوله‌های حساس به مواد ضد میکروبی است (۴، ۲). در اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری نیز بیان ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های مقاوم به داروهای ضد میکروبی در مقایسه با ایزوله‌های حساس به داروها کمتر گزارش شده است (۵).

هیدروفوبیسیتی سطحی عامل مهمی در ایجاد عفونت برای اتصال و به دنبال آن تکثیر میکروارگانیسم بر سطوح جامد و اتصال به یکدیگر به شمار می‌رود. این اتصالات پیوندهای اختصاصی و یا غیر اختصاصی می‌باشند و به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سطوح باکتری مانند هیدروفوب (آب‌گریز) بودن آن بستگی دارند (۶). از عوامل بیماری‌زای دیگر این باکتری می‌توان به ایجاد آنزیم‌های مختلف مانند الاستاز اشاره کرد. الاستاز به دلیل اهمیت الاستین در بافت رگ‌های خونی و ریه‌ها، عامل اصلی بروز بیماری‌های تنفسی و ضایعات عروقی همراه با خونریزی است. در تخریب الاستین اثر همکاری (Synergism) میان آنزیم‌های الاستاز و پروتئاز Las A وجود دارد (۷، ۳).

ژن Las R در فرایند سیستم درک حد نصاب دخیل است. این ژن کد کننده یکی از پروتئین‌های فعال سلولی می‌باشد و سویه‌های فاقد این ژن فعال قدرت بیماری‌زایی در مدل‌های حیوانی را ندارند (۸). از جمله شاخص‌های کنترل شونده توسط سیستم Las R می‌توان به Las I، الاستاز، پروتئاز Las A، پروتئاز قلیایی و اگزوتوکسین A اشاره کرد (۷، ۳).

شاخص‌های ویرولانس در نمونه‌های محیطی گزارش شده و توانایی این باکتری‌ها در ایجاد عفونت مجاری ادراری در موش آزمایشگاهی تأیید گردیده است (۹). تولید بیوفیلم نیز به عنوان یک عامل ویرولانس هم در نمونه‌های محیطی و هم در نمونه‌های بالینی گزارش شده و تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه از نظر داشتن برخی شاخص‌های ویرولانس مشاهده نشده است (۹). ژن Las R عامل دیگر ویرولانس سودوموناس آئروژینوزا است که در بسیاری از ایزوله‌های بالینی و به خصوص در باکتری‌های جدا شده از موارد فیبروز سیستیک یافت می‌شود و هم ایزوله‌های دارای این ژن و هم ایزوله‌های فاقد آن قدرت تولید بیوفیلم را دارند (۱۱، ۱۰).

مطالعه بر روی شاخص‌های ویرولانس باکتری در سطح سلولی و مولکولی جهت شناسایی اهداف مهم برای مقابله با باکتری و یافتن روش‌های مناسب درمانی الزامی است. بیشتر مطالعات صورت گرفته بر روی سودوموناس آئروژینوزا بر روی ایزوله‌های استاندارد این باکتری انجام شده است. هدف از این بررسی، مقایسه بین تولید بیوفیلم، هیدروفوبیسیتی سطحی (Cell surface hydrophobicity یا

CSH)، تولید پروتئازهای Las B و Las A و بررسی حضور ژن Las R در ایزوله‌های محیطی با ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا بود.

روش بررسی

در مطالعه حاضر بیش از ۱۰۰ نمونه خاک و آب از حوضچه‌های آب و خاک زمین‌های اطراف فضاهای سبز و محیط‌های دور از آلودگی بیمارستانی مورد بررسی قرار گرفت که تنها ۲۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جداسازی گردید. اگر آب یا خاک در یک منطقه هر دو مثبت بود، تنها از یک نمونه استفاده می‌شد. همچنین ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از کشت نمونه‌های مختلف شامل خون، ادرار، زخم، سوختگی و مایعات مختلف بدن جداسازی شد و مورد بررسی قرار گرفت.

کلنی‌های رشد کرده از کشت اولیه که از نظر مشخصات کلنی، تولید رنگدانه و داشتن بوی خاص مشکوک به سودوموناس آئروژینوزا بودند، به محیط سیتریماید آگار منتقل و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. از آزمون اکسیداز و سایر آزمون‌های استاندارد جهت شناسایی باکتری‌ها استفاده گردید (۱۲). ایزوله‌ها جهت انجام آزمایش‌های بعدی در محیط TSB (Trypticase soy broth) با ۴۰ درصد گلیسرول و دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

از سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC و سودوموناس آئروژینوزا PAO1 جهت کنترل آزمایش‌ها و از سویه استافیلوکوک اورئوس ATCC:۲۵۹۲۳ برای اندازه‌گیری آنزیم پروتئاز Las A استفاده شد (۱۳). آنتی‌سرم‌های سودوموناس آئروژینوزا از شرکت MAST (England) تهیه گردید. آنتی‌سرم‌ها شامل سه گروه آنتی‌سرم‌های پلی‌والانت (پلی‌والانت گروه یک شامل سروتایپ‌های L، I، H، C و A؛ پلی‌والانت گروه دو شامل سروتایپ‌های M، K، J و B و پلی‌والانت گروه سه شامل سروتایپ‌های N، G، F، E و D) و آنتی‌سرم‌های مونووالانت مربوطه بودند. انجام آزمایش بر اساس دستورالعمل شرکت ابتدا با آنتی‌سرم‌های پلی‌والانت و سپس با آنتی‌سرم‌های مونووالانت انجام شد.

از کشت اولیه باکتری‌ها در محیط LB (Luria–Bertani) (LB medium; Hi Media, India) که در شرایط هوازی و در شیکر انکوباتور (Axyos Technologies, Queensland; Australia) با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و تا اوایل فاز سکون گرمخانه‌گذاری شده بود، جهت تلقیح به محیط کشت LB استفاده شد. برای بررسی CSH باکتری‌ها در مرحله رشد لگاریتمی (جذب نوری معادل ۰/۹ تا ۱/۱ به مدت ۹-۸ ساعت) (۱۴) (بر اساس منحنی استاندارد رشد) و جهت بررسی بیوفیلم، الاستاز LAS B و پروتئاز LAS A باکتری‌ها تا اوایل فاز سکون (جذب نوری معادل با ۱/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در شیکر انکوباتور قرار داده شدند (۱۶، ۱۵، ۱۳). سپس باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار رسوب داده شدند و غلظت مناسب سوسپانسیون میکروبی در بافر فسفات سالین (Phosphate buffered saline یا PBS) استریل (pH = ۷/۱) بر اساس نوع آزمایش‌ها تهیه شد.

سوسپانسیون باکتری با جذب نوری حدود ۱/۹۱-۰/۹۰ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه گردید. گزیلول (Merck, Germany) به سوسپانسیون میکروبی ایزوله‌ها اضافه و دو دقیقه ورتکس شد. بعد از گذشت ده دقیقه و با جداسازی فاز آبی، جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری (A۱) و درصد CSH با استفاده از فرمول [(درصد) ۱۰۰ (A۱/A۰)-۱] محاسبه گردید (۱۴).

سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری معادل ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر برای تمامی ایزوله‌ها تهیه شد. از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل با جنس پلی‌استیرن (Falcon, USA) جهت بررسی اتصال باکتری به سطح و تولید بیوفیلم استفاده گردید. سوسپانسیون‌های میکروبی (۱۰۰ میکرولیتر) به چاهک‌ها اضافه و پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (۱۶). برای رنگ‌آمیزی، محلول کریستال ویوله ۱ درصد به

مدت ۱۵ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت و جهت حذف رنگ اضافه، چاهک‌ها سه بار با آب مقطر استریل شستشو و سپس خشک شدند. اتانول ۹۵ درصد برای انحلال رنگ‌های متصل به سلول باکتری دخیل در بیوفیلم استفاده شد و رنگ حاصل در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه ELISA reader (BioTek-ELX800) خوانده شد (۱۶). بر اساس میانگین جذب نوری ایزوله‌ها و مقایسه آن‌ها با جذب نوری شاهد منفی (محیط کشت بدون باکتری) و جذب در محدوده برش (Cut-off OD) بیوفیلم به سه دسته ضعیف، متوسط و قوی تقسیم‌بندی شد (۱۷).

سوسپانسیون با جذب نوری ۱/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. این محلول برای بار دوم در ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برای اندازه‌گیری الاستاز، پروتئاز و میزان پروتئین جمع‌آوری شد (۱۵، ۱۳).

برای اندازه‌گیری الاستاز ابتدا بافر Elastin-Congo red شامل تریس ۱۰۰ میلی‌مولار و کلرید کلسیم ۱ میلی‌مولار با pH = ۷/۵ تهیه و استریل شد (۳). در میکروتیوب‌ها ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر Elastin-Congo Red (Sigma Chemical Company, USA) و سوپرنتنت کشت میکروبی به بافری حاوی Congo red اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، میکروتیوب‌ها در انکوباتور شیکردار نمونه‌ها سانتریفیوژ و محلول رویی به پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل و در طول موج ۴۹۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیمی به صورت جذب نوری بر میکروگرم پروتئین بیان شد (۳). برای اندازه‌گیری پروتئاز LAS A، محلول جوشانده شده استافیلوکوک اورئوس 25923ATCC به عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات در جذب نوری بر ساعت بر میکروگرم بیان شد (۱۵).

مقدار پروتئین سوسپانسیون و محلول رویی ایزوله‌ها توسط روش Bradford اندازه‌گیری شد (۱۸). جداسازی DNA ایزوله‌ها بر اساس روش Micro-Kalman با کیت تجاری (سیناژن) استخراج و از پرایمرهای زیر برای بررسی وجود ژن LAS R استفاده شد. طول ژن موردنظر معادل با ۷۲۵ جفت باز (Base pair یا bp) می‌باشد (۱۹).

Start primer: 5-ATGGCCTTGGTTGACGGTT-3

Stop primer: 5-GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCCA-3

پروتکل انجام PCR (Polymerase chain reaction)

مرحله دناتوراسیون به صورت ۷ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۴ سیکل مجدد در همین دما، مرحله التهاب ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، مرحله گسترش ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک گسترش در پایان به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد انجام شد (۱۹).

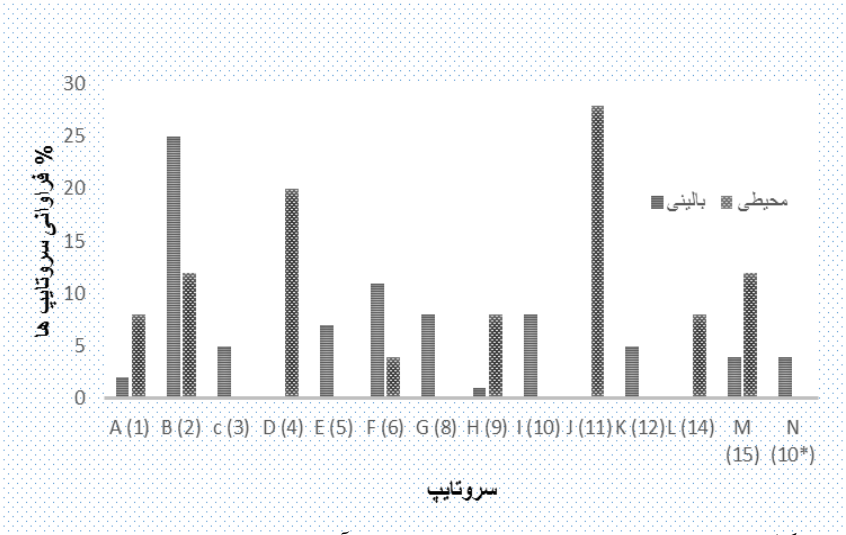
جهت بررسی نتایج و تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون Kolmogorov-Smirnov تأیید گردید. برای تعیین ارتباط متغیرهای عددی متناظر محیطی و بالینی از آزمون ضریب همبستگی پیرسون و جهت مقایسه مقادیر موجود در زیرگروه‌های منشأ نمونه‌ها (آب و خاک) از آزمون‌های t مستقل برای آب و خاک در گروه محیطی استفاده گردید.

نتایج

فراوانی سروتایپ‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های بالینی و محیطی سودوموناس آئروژینوزا

در نمونه‌های بالینی پس از سروتایپ B که بیشترین فراوانی و تفاوت را با سایر سروتایپ‌ها داشت ($P \leq ۰/۰۰۱$)، فراوانی سایر سروتایپ‌ها به طور نسبی مشابه بود. در این نمونه‌ها سروتایپ‌های D، L و J مشاهده نشد. سروتایپ J در نمونه‌های محیطی غالب بود؛ در حالی که برخی سروتایپ‌ها مانند سروتایپ I، G، E، C و K در این نمونه‌ها

وجود داشت (شکل ۱). تعداد ۴ ایزوله با آنتی‌سرم‌های مربوط قابل تایپ نبودند. مقایسه فراوانی نوع سروتایپ‌های غالب در دو گروه بالینی و محیطی اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد ($P \leq ۰/۰۰۱$).



شکل ۱. *فراوانی سروتایپ‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های بالینی و محیطی*

فراوانی سروتایپ‌ها با دو روش گروه‌بندی DENKA (حروف انگلیسی) و Homma (عددی) نشان داده شده است (۲۰)

مقایسه CSH، تولید بیوفیلم و پروتئازهای Las A و Las B در نمونه‌های بالینی و محیطی سودوموناس آئروژینوزا

CSH به صورت قوی، متوسط و ضعیف گروه‌بندی شد (۱۴). تفاوت آماری معنی‌داری بین ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی با یکدیگر و نمونه‌های محیطی مشاهده نشد (جدول ۱). میزان ایزوله‌های تولید کننده بیوفیلم در باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی در مورد نمونه‌های خون و سوختگی قوی‌تر بود، اما اختلاف آماری معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد (جدول ۲). تولید بیوفیلم در نمونه‌های بالینی به طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های محیطی بود؛ به طوری که ۹۲ درصد از ایزوله‌های محیطی بیوفیلم ضعیفی داشتند ($P \leq ۰/۰۰۹$) و نمونه‌های بالینی تنها ۵۳ درصد بیوفیلم ضعیف را نشان دادند.

جدول ۱. *میزان CSH در نمونه‌های مختلف بالینی (۱۰۰ نمونه) و محیطی (۲۵ نمونه) سودوموناس آئروژینوزا*

CSH	تعداد (درصد) موارد مثبت				
	ادرار	خون	زخم و سوختگی	نمونه‌های متفرقه	نمونه‌های محیطی
ضعیف	۶ (۱۶/۲)	۴ (۲۸/۶)	۵ (۱۳/۵)	۴ (۳۳/۴)	۶ (۲۴/۰)
متوسط	۲۸ (۷۵/۷)	۷ (۵۰/۰)	۲۶ (۷۰/۳)	۷ (۵۸/۳)	۱۵ (۶۰/۰)
قوی	۵ (۱۳/۵)	۳ (۲۱/۴)	۶ (۱۶/۲)	۱ (۸/۳)	۴ (۱۶/۰)
جمع کل	۳۷	۱۴	۳۷	۱۲	۲۵

CSH: Cell surface hydrophobicity

CSH با روش اتصال به هیدروکربن‌ها بررسی شد و میزان کمتر از ۲۰ درصد به عنوان ضعیف، بین ۵۰-۳۰ درصد متوسط و بالاتر از ۵۰ درصد به عنوان قوی در نظر گرفته شد

جدول ۲. *تولید بیوفیلم در نمونه‌های مختلف بالینی (۱۰۰ نمونه) و محیطی (۲۵ نمونه) سودوموناس آئروژینوزا*

تولید بیوفیلم	تعداد (درصد) موارد مثبت				
	ادرار	خون	زخم و سوختگی	نمونه‌های متفرقه	نمونه‌های محیطی
ضعیف	۱۸ (۴۸/۷)	۶ (۴۲/۹)	۵ (۱۳/۵)	۹ (۷۵/۰)	۲۳ (۹۲/۰)
متوسط	۱۶ (۴۳/۲)	۷ (۵۰/۰)	۲۶ (۷۰/۳)	۳ (۲۵/۰)	۱ (۴/۰)
قوی	۳ (۸/۱)	۱ (۷/۱)	۶ (۱۶/۲)	۰ (۰/۰)	۱ (۴/۰)
جمع کل	۳۷	۱۴	۳۷	۱۲	۲۵

تولید بیوفیلم با روش کریستال ویولت بررسی شد و بر اساس جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر به سه گروه ضعیف [OD ≤ ۰/۱۳ (Optical density)]، متوسط (۰/۱۴-۰/۲۷ = OD) و قوی (OD ≥ ۰/۲۸) تقسیم‌بندی شد

فعالیت آنزیم Las A در نمونه‌های بالینی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت (P ≤ ۰/۰۵۰)؛ در حالی که این آنزیم در ایزوله‌های بالینی در مقایسه با ایزوله‌های محیطی فعالیت بیشتری نشان داد (P ≤ ۰/۰۱۰). فعالیت آنزیمی Las B در نمونه‌های مختلف بالینی اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد (P = ۰/۰۰۱) (جدول ۳)؛ به طوری که میزان این آنزیم در ایزوله‌های مربوط به نمونه‌های متفرقه بیشتر و در ایزوله‌های مربوط به سوختگی کمتر از سایر نمونه‌ها بود. اگرچه در نمونه‌های بالینی فعالیت آنزیمی Las B بیشتر از ایزوله‌های محیطی بود، اما اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ۳. *فعالیت آنزیم‌های Las A و Las B در نمونه‌های مختلف بالینی (۱۰۰ نمونه) و محیطی (۲۵ نمونه) سودوموناس آئروژینوزا*

آنزیم	فعالیت آنزیمی در نمونه‌های مختلف (میانگین ± انحراف معیار)				
	ادرار	خون	زخم و سوختگی	نمونه‌های متفرقه	محیطی
Las A	۰/۳۴ ± ۰/۲۱	۰/۰۲ ± ۰/۲۱	۰/۰۲ ± ۰/۲۱	۰/۰۴ ± ۰/۱۸	۰/۰۵ ± ۰/۱۸
Las B	۷/۰۴ ± ۴/۷	۶/۴۷ ± ۶/۰۲	/۲۴۲۴۲۲۲۴۴۲۴۲۲۴ ۴/۱۲ ± ۳	۱۰/۲۵ ± ۵/۱۱	۵/۹۱ ± ۳/۳۳

آزمایش‌ها بر روی محلول فیلتر شده محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط LB انجام شد

فعالیت Las B و Las A به ترتیب با سوبسترای Congo red و استافیلوکوک اورئوس جوشانده شده انجام گردید و به صورت تغییر در جذب نوری بر میکروگرم پروتئین بر ساعت گزارش شد

بحث

سودوموناس آئروژینوزا به علت کسب ژن‌های متعدد در طول تکامل و به منظور تطابق با محیط و در واکنش به شرایط محیطی در اطراف خود ماتریکس خارجی تولید می‌نماید. تولید پلی‌ساکارید ماتریکس به علت آنتی‌ژن‌های گروهی O در لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide یا LPS) باکتری است. ویژگی LPS، حرکت تاژک، تولید بیوفیلم، شناسایی گیرنده‌های سطح سلول میزبان و بسیاری از عوامل مرتبط با بیماری‌زایی با یکدیگر ارتباط دارد و سیستم QS تنظیم کننده بسیاری از این فعالیت می‌باشد (۱). گروه‌بندی سرولوژیک بر اساس آنتی‌ژن‌های گروهی O از روش‌های اپیدمیولوژیک متداولی است که می‌تواند برای شناسایی کلون‌های میکروبی که در یک جامعه گسترده شده‌اند، مورد استفاده قرار گیرد. وجود سیستم‌های مختلف برای گروه‌بندی سرولوژیک سودوموناس آئروژینوزا مطالعه سرولوژیک این باکتری را با اشکال روبه‌رو کرده است.

روش‌های متعددی برای گروه‌بندی سرولوژیک پیشنهاد و در نهایت یک سیستم شامل ۱۷ گروه برای این باکتری‌ها در نظر گرفته شد (۲۱، ۲۰).

سروتایپ غالب در نمونه‌های بالینی بررسی حاضر، سروتایپ (O:2) B و در نمونه‌های محیطی، سروتایپ J(O:11) بود که سروتایپ مزبور در نمونه‌های بالینی مشاهده نشد. در سایر بررسی‌ها نیز سروتایپ O:11 به عنوان سروتایپ غالب گزارش شده است (۲۵-۲۱). در بررسی‌های انجام شده در ایران و جهان فراوانی سروتایپ‌ها با یکدیگر متفاوت و در سال‌های مختلف تغییراتی در تنوع سروتایپ‌ها مشاهده شده است، ولی در بیشتر مطالعات سروتایپ‌های غالب در نمونه‌های بالینی شامل سروتایپ‌های O:12، O:10، O:3، O:2، O:6 و O:11 می‌باشد (۲۵-۲۱) که با بررسی حاضر مطابقت دارد.

مسأله مهم، اهمیت این سروتایپ‌ها در عفونت‌های سودوموناسی است. در مطالعه‌ای ارتباط بین سروتایپ O:11 و تولید بیوفیلم قوی و گروه O:6 با بیوفیلم ضعیف گزارش شده است (۲۲). در بررسی حاضر ایزوله‌های تولید کننده بیوفیلم متوسط و قوی به ترتیب سروتایپ‌های O:2 و O:6 بودند (۸۶/۶ و ۸۳/۳ درصد) که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با سایر سرو گروه‌ها داشتند (P = ۰/۰۱۰). در حالی که در سروتایپ O: 11 (که بیشتر در نمونه‌های محیطی بود) هیچ موردی از بیوفیلم قوی مشاهده نشد. با توجه به این که سروتایپ O:2 و O:6 معمول‌ترین سروتایپ در نمونه‌های بالینی و O:11 سروتایپ غالب در نمونه‌های محیطی بود، نتایج حاصل دور از انتظار نبود و نشان دهنده ارتباط بین سروتایپ‌ها و بیماری‌زایی باکتری می‌باشد.

CSH یکی از شاخص‌های ویرولانس در سطح باکتری‌ها است. در بررسی حاضر تفاوت معنی‌داری بین CSH در نمونه‌های جدا شده از محیط و بالین دیده نشد که با مطالعه Kustos و همکاران (۶) همخوانی دارد. توانایی سودوموناس آئروژینوزا در از بین بردن الاستین به واسطه آنزیم‌های پروتئاز Las A و الاستاز Las B نقش مهمی در بیماری‌زایی و تکثیر باکتری در بافت‌ها ایفا می‌کند. در تخریب الاستین اثر سینرژی بین الاستاز و آنزیم پروتئاز Las A وجود دارد. در مطالعه حاضر آنزیم الاستاز Las B در تمام نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد و اگرچه میزان آن در نمونه‌های محیطی کمتر بود، اما اختلاف آماری معنی‌داری در این مورد بین نمونه‌های بالینی و محیطی وجود نداشت. این نتایج با تحقیق Bradbury و همکاران که ژن کد کننده آنزیم مزبور را در تمام نمونه‌ها با روش PCR مشاهده و عامل الاستاز را در نمونه‌ها گزارش کردند (۲۶) و همچنین بررسی Finnan و همکاران در کشور ایرلند که آنزیم الاستاز Las B را در همه نمونه‌های بالینی و محیطی مورد بررسی مشاهده کرده‌اند (۲۷)، مطابقت دارد.

فعالیت آنزیم پروتئاز Las A در نمونه‌های بالینی به طور معنی‌داری بیشتر از فعالیت آن در ایزوله‌های محیطی بود که تا حد زیادی با مطالعه منصوری و همکاران (۲۸) هماهنگ است. در مطالعه آن‌ها فعالیت آنزیم پروتئاز Las A در ایزوله‌های مقاوم به داروهای ضد میکروبی و تولید کننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده به طور معنی‌داری بیشتر از ایزوله‌های حساس به داروهای ضد میکروبی بود (۲۸)؛ چرا که ایزوله‌های بالینی در مقایسه با ایزوله‌های محیطی دارای مقاومت بیشتری در برابر داروهای ضد میکروبی می‌باشند.

ژن Las R با روش PCR در تمام نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه مثبت بود که با مطالعه Karatuna و Yagci از کشور ترکیه (۲) همخوانی دارد. Las R کنترل کننده تولید بسیاری از شاخص‌های ویرولانس مانند پروتئازها، لیپاز، فسفولیپاز، متابولیت‌های ثانویه و اگزوتوکسین‌ها می‌باشد. این ژن نقش مهمی در سیستم QS داشته و گزارش شده است که سویه‌های فاقد آن در حیوانات آزمایشگاهی بیماری‌زا نیستند (۸). سویه‌های موتاسیون یافته Las R هم در ایزوله‌های محیطی و هم ایزوله‌های بالینی سودوموناس

ایروژینوزا گزارش شده‌اند. این سویه‌ها در مقایسه با سویه‌های وحشی آهسته‌تر رشد می‌کنند و مقاومت بیشتری نسبت به آنزیم‌های لیز کننده و پروتئولیتیک از خود نشان می‌دهند (۱۰). نداشتن این ژن دلیل بی‌اهمیت بودن آن در باکتری نبوده، بلکه به‌نظر می‌رسد با این روش باکتری به هدف خود جهت بقای بیشتر در محیط دسترسی می‌یابد (۱۱، ۲). اگرچه اطلاعات زیادی در مورد شاخص‌های ویرولانس در نمونه‌های جدا شده از بیماران با فیبروز سیستیک و یا سویه‌های استاندارد باکتری وجود دارد، اما اطلاعات اندکی در مورد ایزوله‌های جدا شده از سایر منابع و یا نمونه‌های محیطی در دسترس است. تحقیقات متعدد نشان داده است که تمام شاخص‌های ویرولانس در ژنوم باکتری وجود دارد و بیشتر ژن‌های در ارتباط با ویرولانس به صورت ثابت و بدون تغییر می‌باشند و شرایط محیطی سبب بیان آن‌ها می‌گردد (۲۶، ۹).

بیشتر مطالعات در مورد ویرولانس باکتری‌ها به ارتباط بین مقاومت به داروهای ضد میکروبی با ویرولانس پرداخته‌اند. برای مثال تولید شاخص‌های ویرولانس در ایزوله‌های مقاوم به چندین دارو کمتر از ایزوله‌های حساس به داروها گزارش شده است (۴). از طرف دیگر، فراوانی برخی شاخص‌های بیماری‌زا در ایزوله‌های مقاوم به دارو و یا نمونه‌های محیطی بیشتر از ایزوله‌های حساس به داروها و یا نمونه‌های بالینی محیطی گزارش شده است (۲۸، ۲۷).

قابل قبول‌ترین فرضیه در این مورد می‌تواند از دست دادن ژن‌های ویرولانس به منظور بقای بیشتر در محیط باشد (۱۱، ۲).

به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده در بررسی حاضر، به‌نظر می‌رسد که قانون کلی در ارتباط با تولید شاخص‌های ویرولانس در سودوموناس آئروژینوزا وجود ندارد و در بسیاری از موارد ایزوله‌های محیطی نیز شاخص‌های ویرولانسی (مانند تولید بیوفیلم، CSH، تولید الاستاز و پروتئازها) را در مقایسه با ایزوله‌های بالینی دارا می‌باشند. در ایزوله‌های بالینی مقاوم به چندین دارو و نیز ایزوله‌های محیطی و بالینی تفاوت می‌تواند در بیان ژن‌ها و در ارتباط با شرایط باکتری باشد. در این راستا بررسی بر روی تعداد نمونه‌های بیشتر و مطالعه و مقایسه بیان ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های بالینی و محیطی می‌تواند امیدبخش یافتن راهکارهای مؤثرتری جهت کنترل و پیشگیری از عفونت‌های سودوموناسی در گروه‌های با خطر عفونت با این باکتری به ظاهر فرصت‌طلب باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که با تصویب و تأمین هزینه این طرح (شماره ۹۰/۲۸۷) امکان اجرای پژوهش را میسر ساختند، تشکر می‌گردد.

References

1. Frank DW. Research Topic on Pseudomonas aeruginosa, Biology, Genetics, and Host-Pathogen Interactions. *Front Microbiol* 2012; 3: 20.
2. Karatuna O, Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in Pseudomonas aeruginosa respiratory isolates. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(12): 1770-5.
3. Kessler E, Safrin M, Gustin JK, Ohman DE. Elastase and the LasA protease of Pseudomonas aeruginosa are secreted with their propeptides. *J Biol Chem* 1998; 273(46): 30225-31.
4. Deptula A, Gospodarek E. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant

Pseudomonas aeruginosa strains. *Arch Microbiol* 2010; 192(1): 79-84.

5. Farshad S, Emamghoraishi F, Japoni A. Association of virulent genes hly, sfa, cnf-1 and pap with antibiotic sensitivity in *Escherichia coli* strains isolated from children with community-acquired UTI. *Iran Red Crescent Med J* 2012; 12(1): 33-7. [In Persian].
6. Kustos T, Kustos I, Kilar F, Rappai G, Kocsis B. Effect of antibiotics on cell surface hydrophobicity of bacteria causing orthopedic wound infections. *Chemotherapy* 2003; 49(5): 237-42.
7. Kessler E, Safrin M, Blumberg S, Ohman DE. A continuous spectrophotometric assay for Pseudomonas aeruginosa LasA protease (staphylolysin) using a two-stage enzymatic reaction. *Anal Biochem* 2004; 328(2): 225-32.
8. Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP. Identification of genes controlled by quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(24): 13904-9.
9. Kumar R, Chhibber S, Harjai K. A comparative study of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in terms of quorum sensing, outer membrane proteins and their ability to cause urinary tract infection. *Am J Biomed Sci* 2009; 1(3): 205-14.
10. Perez LR, Machado AB, Barth AL. The presence of quorum-sensing genes in Pseudomonas isolates infecting cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Curr Microbiol* 2013; 66(4): 418-20.
11. Sandoz KM, Mitzimberg SM, Schuster M. Social cheating in Pseudomonas aeruginosa quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(40): 15876-81.
12. Mahon CR, Manuselis G. Non fermenting and mmiscellaneous gram negative bacilli. In: Mahon CR, Manuselis G, editors. Textbook of diagnostic microbiology. 2nd ed. Saunders; 2000. p. 482-503.
13. Kong KF, Jayawardena SR, Indulkar SD, Del PA, Koh CL, Hoiby N, et al. Pseudomonas aeruginosa AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(11): 4567-75.
14. Pijanowska A, Kaczorek E, Chrzanowski L, Olszanowski A. Cell hydrophobicity of Pseudomonas spp. and Bacillus spp. bacteria and hydrocarbon biodegradation in the presence of Quillaya saponin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007; 23(5): 677-82.
15. George M, Pierce G, Gabriel M, Morris C, Ahearn D. Effects of quorum sensing molecules of Pseudomonas aeruginosa on organism growth, elastase B production, and primary adhesion to hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens* 2005; 31(2): 54-61.
16. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Mol Microbiol* 1998; 30(2): 295-304.
17. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175-9.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

19. Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Hoiby N. Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants. *Microbiology* 2010; 156(Pt 4): 1108-19.

20. Bacterial Typing Antisera Handbook Available at :denka-seiken.jp/english/pdf/.bacterial-handbook4th.pdf.version4.October 2006.

21. Tassios PT, Gennimata V, Maniatis AN, Fock C, Legakis NJ. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant Pseudomonas aeruginosa serogroup O:11. The Greek Pseudomonas Aeruginosa Study Group. *J Clin Microbiol* 1998; 36(4): 897-901.

22. Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of Pseudomonas aeruginosa serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* 2002; 28(4): 340-8.

23. Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (IRAN). *Burns* 2003; 29(6): 547-51.

24. Vitkauskiene A, Skrodeniene E, Jomantiene D, Macas A, Sakalauskas R. Changes in the dependence of Pseudomonas aeruginosa O serogroup strains and their resistance to antibiotics in a university hospital during a 5-year period. *Medicina (Kaunas)* 2011; 47(7): 361-7.

25. Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S, Aghazadeh M, Iversen A, Edquist P, et al. A multiresistant clone of Pseudomonas aeruginosa sequence type 773 spreading in a burn unit in Orumieh, Iran. *APMIS* 2013; 121(2): 146-52. [In Persian].

26. Bradbury RS, Roddam LF, Merritt A, Reid DW, Champion AC. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 8): 881-90.

27. 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(12): 5783-92.

28. Mansouri S, Norouzi F, Moradi M, Nakhaee N. Comparison of virulence factors among clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* producing and non-producing extended spectrum â-lactamases. *Currt Res Bacteriol* 2011; 4(3): 85-93. [In Persian].

Serological Classification and Comparison of Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm and Proteases Formation between the Clinical and Environmental Isolates of Pseudomonas Aeruginosa

Hadi Lotfi, M.Sc.[1], Shahla Mansouri, Ph.D.[2*]

1. Graduate Student of Microbiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Professor, Department of Microbiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: smansouri@kmu.ac.ir

(Received: 5 April 2014 Accepted: 18 June 2014)

Abstract

Background & Aims: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen and an important cause of nosocomial infections. Different factors are involved in the pathogenicity of this bacterium. This study was performed to compare some factors associated with the virulence of clinical and environmental isolates of *P. aeruginosa.*

Methods: The present study was performed on 25 environmental isolates (soil, water) and 100 clinical isolates (blood, urine, wound, burn wound, and body fluids). Serotyping was performed with monovalent and polyvalent antisera. Cell surface hydrophobicity (CSH) was tested through bacterial attachment to hydrocarbons, and biofilm formation was detected through crystal violet staining method. LasA protease and LasB elastase were determined using Gongo red or boiled *Staphylococcus aureus* suspension as the substrates, respectively. LasR gene was detected using polymerase chain reaction (PCR) method.

Results: The most common serotype among the isolates was serotype B (23.52% in clinical and 12% in environmental isolates). Serotype B was more prevalent in clinical isolates, and serotype J was found with a higher frequency in environmental samples. This serotype was not found in clinical samples. Mean production of CSH, biofilm formation, and LasA protease and LasB elastase was higher in the clinical isolates than environmental isolates. The difference between clinical and environmental isolates was significant in the case of LasA protease (P = 0.010). The LasR genes was detected in all clinical and environmental isolates

Conclusion: Differences in serotype prevalence and the higher prevalence of LasA in the clinical isolates is an important issue. Owing to the lack of significant differences between clinical and environmental samples in respect to other virulence factors, it seems that the expression of virulence factors could be effected by environmental conditions. Further studies with higher number of isolates and evaluation of virulence gene expression is needed to confirm these results

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Virulence factors, Clinical samples, Environmental samples

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(2): 133-143