مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت)
دوره ۱۱ شماره ۶ بهمن و اسفند ۱۳۹۶، ۶۹۳-۶۸۵

مقاله پژوهشی

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

# شناسایی ژن پیووردین Pyoverdine در جدایه های دامی و انسانی سودوموناس آئروژینوزا با روش Multiplex-PCR

الهام رنجبر[۱]، دکتر کیومرث امینی [۲]

دریافت مقاله : تیر ۱۳۹۶
پذیرش مقاله : آذر ۱۳۹۶

*نویسنده مسئول :
دکتر کیومرث امینی؛
دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه
Email :
dr_kumarss_amini@yahoo.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی به ویژه در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و کودکان است. شدت بیماری زایی ناشی از حضور ژن پیووردین PVD است و تاثیرات زیادی در نوع وحشی باکتری طی مسیر عفونت زایی ایفا می کند. شناسایی کلاس های مختلف ژن پیووردین برای تدوین برنامه ی پیشگیری و مبارزه امری لازم و ضروری به شمار می آید. در این تحقیق سعی شده است که با جداسازی و بررسی حضور ژن های PVD در نمونه ها، قدرت تاثیرگذاری آن در شدت بیماری زایی ارزیابی گردد.

**روش بررسی:** ابتدا ۶۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا جمع آوری شده از نمونه های بالینی دام و انسان، پس از تایید توسط آزمایش های تشخیصی و افتراقی، بررسی گردید. درنهایت برای هر ۶۰ جدایه، Multiplex PCR جهت ردیابی ژن های کد کننده ی پیووردین انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که فراوانی ژن PVD کد کننده ی کلاس ۳ پیووردین در جدایه های انسانی و دامی، بیشترین فراوانی با ۷۶/۶٪ درصد شایع ترین و کمترین فراوانی مربوط به کلاس ۲ پیووردین با ۴۶٪ بوده است.

**نتیجه گیری:** شناسایی هر سه نوع کلاس PVD در سویه های سودوموناس آئروژینوزای مورد آزمایش، می تواند کمک زیادی به شناسایی نمونه های مبتلا به عفونت سودوموناسی نماید. با توجه به حضور ژن های کد کننده ی PVD که رابطه ی مستقیمی در قدرت بیماری زایی باکتری دارد بررسی و تحقیق در این مورد حایز اهمیت است.

**واژه های کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، پیووردین، PCR چندگانه

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

[۲] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

## مقدمه

جنس سودوموناس در گروه بزرگی از باکتری ها بوده و بیش از ۸۰ گونه از آن شناخته شده است. سودوموناس ها باسیل های گرم منفی مستقیم یا خمیده به اندازه ی ۰/۵ تا ۲ میکرومتر می باشند، اسپور تشکیل نمی دهند، متحرک بوده و دارای یک یا چند تار قطبی می باشند(۱). این باکتری ها به طور وسیعی در طبیعت، در آب، فاضلاب، گرد و غبار، هوا و خاک پراکنده اند و نقش مهمی را در تجزیه مواد آلی بر عهده می گیرند. برخی از آن ها مانند سودوموناس ائروژینوزا در پوست و روده ی انسان به حالت کومنسال زندگی می کنند و به عنوان پاتوژن فرصت طلب عمل می نمایند، در افراد دارای نقص ایمنی با قدرت دفاعی ضعیف و یا مختل شده عفونت ایجاد می نمایند(۲). باکتری در بسیاری از محیط های کشت به سهولت رشد می کند و توانایی تولید رنگدانه های متعددی دارد که شامل رنگدانه فلوئورسنتی سبز رنگ به نام پیوردین و محلول در آب و استیک اسید است، رنگدانه فلوئورسنتی قرمز تیره پیوروبین و رنگدانه فلوئورسنتی سیاه پیوملانین نام دارد(۳و۲). رسپتور سلول های تراکئال برای پیلی سودوموناس(اسیدسیالیک-N-استیل نورامینیک اسید) می باشد. سویه های موکوئیدی سودوموناس یک اگزوپلی ساکارید(آلژینات) تولید می کنند که اتصال جایگزینی در موسین تراکئوبرونشیال(N- استیل گلوکز آمین) وجود دارد. اگزو پلی ساکارید تولید شده توسط سودوموناس ائروژینوزا پلیمری از اسید ماتورونیک و گلوکورونیک است(۶-۴). پیووردین ها ۱۲۰ سال قبل کشف شدند و در سال ۱۸۹۲ نام های مختلفی را برای آن در نظر گرفتند تا نهایتا به پیووردین ختم شد. پیووردین ها سیدروفورهایی هستند که برای به دست آوردن آهن از سودوموناس ها تولید می شوند. حداقل ۶۰ نوع مختلف شیمیایی از پیووردین ها توسط سویه های گوناگون شناخته شده اند. همه آنها شامل یک کروموفور دی هیدروکوئینولین متصل به یک پپتید هستند و این پپتیدها در شرایط خاص از توالی طول های مختلفی دیده می شود(۷و۲و۱). بیوسنتز پیووردین در سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس های فلورسنت یک پروسه ی پیچیده بوده و شروع سنتز آن با حداقل ۱۲ پروتئین مختلف در سیتوپلاسم آغاز و پایان فرایند در پری پلاسم باکتری است. به نظر می رسد که پیووردین در غشای داخلی و به ویژه در غشای سیتوپلاسم باکتری مونتاژ می شود(۸و۱). پیووردین ها(PVDs) رنگدانه مشخص سودوموناس بوده که دارای فلوروسنت است و در واقع سیدروفور اصلی این گونه باکتری ها شامل سودوموناس ائروژینوزا است. نقش بالقوه ی PVD سودوموناس ائورژنزا در انتشار آهن از ترانسفرین بر اساس آزمایش در شرایط in vitro پیشنهاد شده که توانایی آن به رقابت برای آهن در داخل بدن به تازگی نشان داده شده است(۱۰و۹). به تازگی مشخص شده که ترشح پیووردین وابسته به پمپ ATP و تحت کنترل پمپ PvdRT-OpmQ می باشد. این سیستم نه تنها جریان ترشح پیووردین تازه سنتز شده را کنترل نموده بلکه پیووردینی را که در ترکیب با آهن است، در پری پلاسم حمل و نقل می نماید و یا بر هر نوع تجمع پیووردین فلزی دیگر موجود در پری پلاسم نظارت دارد(۱۱و۹). پیووردین سودوموناسی در عفونت های دامی نیز مانند عفونت های انسانی نقش بسیار کلیدی و مهمی ایفا می کند. ضرورت دارد از یک روش سریع برای شناسایی ژن پیووردین fpv سودوموناس ائروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی دام و انسان بهره برد. نقش رنگدانه در حدت و بیماریزایی به دلیل محافظت از باکتری در برابر سیستم دفاعی بدن و ممانعت از فاگوسیتوز بسیار با ارزش و در جهت درمان مناسب و سبب مقاوت دارویی به آنتی بیوتیکها می گردد و برای جلوگیری از عوارض بیماری می توان استفاده ی بهینه کرد. هدف جداسازی و بررسی حضور ژن های PVD در نمونه ها و قدرت تاثیرگذاری آن در شدت بیماریزایی ارزیابی گردید.

## روش بررسی

تعداد ۳۰۰ نمونه(۱۵۰ نمونه شیر دامی و ۱۵۰ نمونه بالینی انسانی اعم از سوختگی، تراشه تنفسی، ادرار، کاتتر وریدی) جمع آوری شد و تنها ۶۰ جدایه موجود از نمونه های دامی در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه تهران و نیمی از جدایه های انسانی در آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد مورد مطالعه قرار گرفت. پس از تهیه این نمونه ها اقدام به کشت، جداسازی و تأیید بیوشیمیایی با کمک محیط های کشت مورد استفاده شامل: سیمون سیترات، مولر هینتون آگار، MR-VP، TSI، LB، SIM، مک کانکی، ستریمیدآگار و EMB و سرانجام جدایه های سودوموناس آئروژینوزا گردید(۱۲).

جداسازی و تأیید بیوشیمیایی سودوموناس ائروژینوزا: جدایه مربوط به سودوموناس ائروژینوزا انتخاب گردید. تشخیص عفونت سودوموناس ائروژینوزا با جداسازی و تشخیص آزمایشگاهی صورت گرفت. جهت شناسایی بیشتر باکتری می توان از تست تحریک تولید رنگدانه پیووردین در محیط مولرهینتون آگار و ستریمیدآگار نیز استفاده کرد. این باکتری به خوبی روی بیشتر محیط های کشت آزمایشگاهی رشد می‌کند و از محیط بلاد آگار و آگار آبی ائوزین متیل تیونین می توان جهت جداسازی استفاده کرد، شناسایی این باکتری بر پایه مورفولوژی نوع گرم، ناتوانی در تخمیر لاکتوز، بوی میوه(با مزه انگور)، ایجاد واکنش

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

اکسیداز مثبت و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد شناسایی می‌شود. ویژگی فلوئورسانس زیر نور فرابنفش نیز در تشخیص فوری کلنی‌های سودوموناس ائروژینوزا کارساز بوده و در تشخیص وجود آن در زخم‌ها کمک می‌کند. استخراج DNA و انجام آزمایش M-PCR نمونه ها جهت شناسایی ژن PVD در شرایط استریل و رعایت کامل نکات مربوط پذیرفته و آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از ژل آگارز ۱درصد الکتروفورزیس صورت گرفت.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده(۱۳)

| Name | Sequence(5´→3´) |
|---|---|
| PVDAI-1F | CGAAGGCCAGAACTACGAGA |
| PVDAI-1R | TGTAGCTGGTGTAGAGGCTCAA |
| PVDAI-2F | TACCTCGACGGCCTGCACAT |
| PVDAI-2R | GAAGGTGAATGGCTTGCCGTA |
| PVDAI-3F | ACTGGGACAAGATCCAAGAGAC |
| PVDAI-3R | CTGGTAGGACGAAATGCGAG |

DNA با استفاده از کیت تجاری استخراج از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران(IRBC=MBK0061) مطابق دستورالعمل ارایه شده توسط کیت استخراج گردید. قبل از ردیابی ژن های مورد مطالعه لازم است ایزوله ها با روش مولکولی تایید شوند که از پرایمرهای PVD استفاده شد. آزمون Multiplex PCR جهت شناسایی این ژن ها بر روی جدایه ها انجام گرفت که توالی های پرایمری و مربوط به شناسایی ژن های کد کننده ی پیووردین به شرکت سینا کلون سفارش و تهیه گردید که در جدول ۱ نشان داده شده و مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱/۵ Mm کلرید منیزیم، ۲۵۰ µmol از dNTP، ۰/۴ µmol از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن های حدت و ۱/۵ واحد از Taq پلی مراز و ۵ میکرولیتر DNA با غلظت(۱۰ نانو گرم) الگو انجام شد. شرایط سیکل حرارتی برای PCR بدین شرح بود: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله ی بسط در ۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند، از اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی استفاده و زیر نور UV مشاهده و بررسی گردید.

## یافته ها

آزمایش های بیوشیمیایی جهت جداسازی و تشخیص سودوموناس آئروژینوزا: در این مطالعه توصیفی- مقطعی تعداد ۶۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا به منظور تایید کلنی ها از تست های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر: رنگ آمیزی گرم (Gram staining) برای باسیل گرم منفی، اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، حرکت مثبت، سیترات مثبت، واکنش TSI به صورت آلکالین/ آلکالین، اندول منفی، متیل رد و ووگس پروسکوئر(MR-VP) منفی، اوره آز مثبت، واکنش تست OF به صورت غیر تخمیری و اکسیداتیو، رشد در ۴۲ درجه سیلیسیوس مثبت و تولید پیگمان در محیط ستریمید آگار(مرک، آلمان) استفاده شد. محصولات استخراج ژنومی تمامی سویه ها به منظور تایید محصول DNA بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و باندهای مربوط ثبت و ضبط گردید.

جدول ۲: نتایج حاصل از Multiplex-PCR سویه های سودوموناس آئروژینوزا

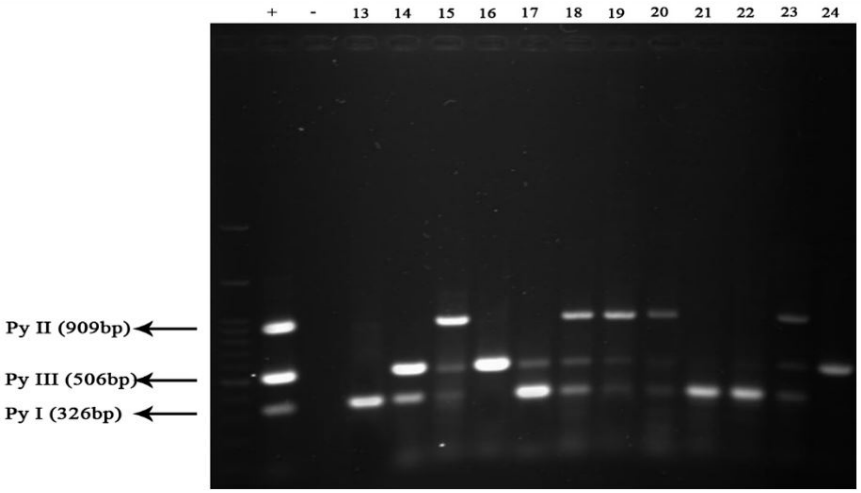
| تعداد کل نمونه ها | *I PVD* | *II PVD* | *III PVD* |
|---|---|---|---|
| ۳۰ نمونه دامی(شیر) | (۹) ٪۵۵ | (۷) ٪۴۶ | (۱۴) ٪۷۶/۶ |
| ۳۰ نمونه انسانی(مختلف) | (۸) ٪۵۵ | (۷) ٪۴۶ | (۱۵) ٪۷۶/۶ |

جدول ۳: نتایج حاصل از Multiplex-PCR سویه های سودوموناس آئروژینوزا به تفکیک نمونه های انسانی

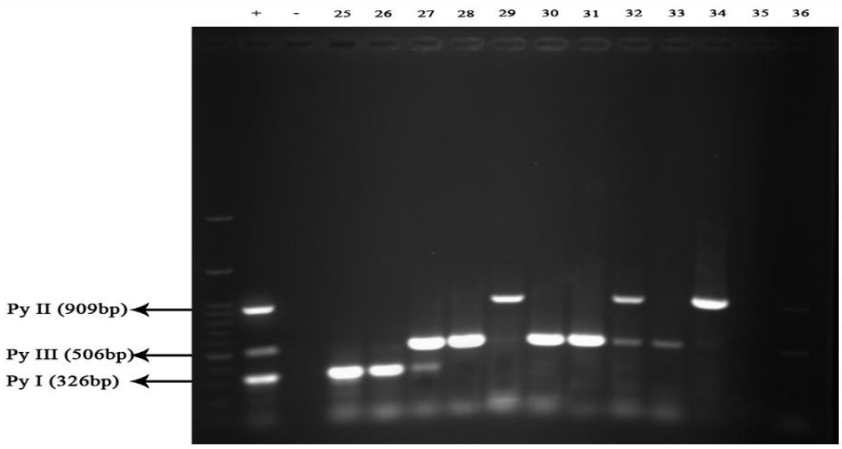
| تعداد کل نمونه های انسانی ۳۰ نمونه | *I PVD* | *II PVD* | *III PVD* |
|---|---|---|---|
| سوختگی | ۲ | ۱ | ۹ |
| تراشه تنفسی | ۳ | ۲ | ۴ |
| کاتتر وریدی | ۱ | ۲ | ۳ |
| ادرار | ۰ | ۱ | ۲ |

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

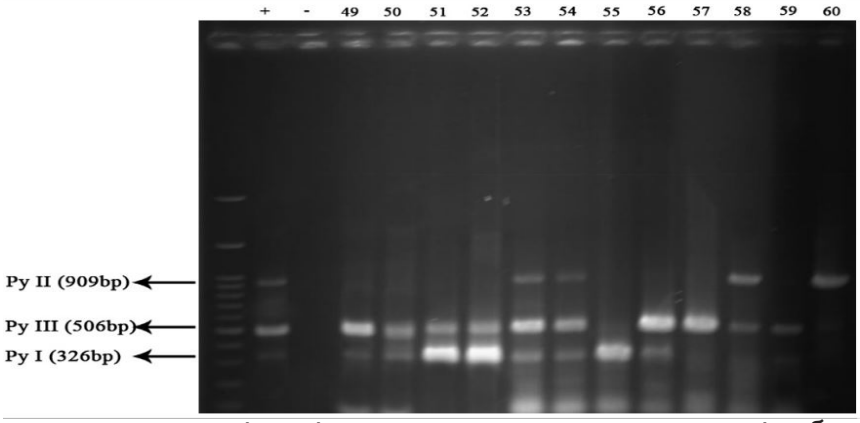
نتایج حاصل از شناسایی مولکولی ژن پیووردین با استفاده از روش Multiplex PCR : با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع ۶۰ جدایه بالینی جهت شناسایی و تایید ژنهای مورد مطالعه در این تحقیق، ۷۶/۶٪ جدایه ها دارای ژن PVD III، ۵۵٪ دارای ژن PVD I و ۴۶٪ دارای ژن PVD Π می باشند(جدول۲و۳) و (نگاره های ۳-۱).




تصویر ۱: نتیجه ی آزمایش M-PCR بر روی تعدادی از جدایه های مثبت انسانی از نمونه ۱۳ تا ۲۴، مارکر ۱۰۰ bp، کنترل مثبت+، کنترل منفی-، جدایه های(۱۳،۱۴،۱۷،۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۲۲،۲۳) مثبت از نظر ژن (۳۲۶ bp) *PVD* I و جدایه های(۱۴،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸،۱۹،۲۳،۲۴) مثبت از نظر ژن(۵۰۶ bp) *PVD* III ، جدایه های(۱۵،۱۸،۱۹،۲۰،۲۳) مثبت از نظر ژن(۹۰۹ bp) *PVD* Π می باشند




تصویر ۲: نتیجه ی آزمایش M-PCR بر روی تعدادی از جدایه های مثبت انسانی از شماره ۲۵ تا ۳۰، جدایه های دامی از ۳۰ تا ۳۶، مارکر ۱۰۰ bp، کنترل مثبت+، کنترل منفی-، جدایه های ۲۷، ۲۶، ۲۵، مثبت از نظر ژن(۳۲۶ bp) *PVD* I و جدایه های ۳۳، ۳۲، ۳۱، ۳۰، ۲۸، ۲۷ مثبت از نظر ژن(۵۰۶ bp) *PVD* III، جدایه های ۳۴، ۳۲، ۲۹ مثبت از نظر ژن(۹۰۹ bp) *PVD* Π می باشند




تصویر ۳: نتیجه ی آزمایش M-PCR بر روی تعدادی از جدایه های دامی مثبت از شماره ۴۹ تا ۶۰، مارکر ۱۰۰ bp، کنترل مثبت+، کنترل منفی-، جدایه های ۵۶، ۵۵، ۵۴، ۵۳، ۵۲، ۵۱، ۵۰، ۴۹ مثبت از نظر ژن(۳۲۶ bp) *PVD* I و جدایه های ۵۹، ۵۸، ۵۷، ۵۶، ۵۴، ۵۳، ۵۲، ۵۱، ۵۰، ۴۹ مثبت از نظر ژن(۵۰۶ bp) *PVD* III، جدایه های ۶۰، ۵۸، ۵۴، ۵۳ مثبت از نظر ژن(۹۰۹ bp) *PVD* Π می باشند

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

## بحث

در این تحقیق ژن پیووردین PVD در جدایه های انسانی و دامی در کلاس ۳ بیشترین فراوانی را داشته که شایع ترین ژن موجود است و کمترین فراوانی مربوط به کلاس ۲ پیووردین است. بسیاری از میکروارگانیسم ها به دلیل داشتن ویژگی های منحصر به فرد و تولید متابولیت های مختلف توانایی بالقوه جهت ورود به میزبانان را یافته که یکی از این ویژگی ها تولید کلنی های رنگی است. تولید این رنگدانه ها نوعی مکانیسم محافظتی در برابر سیستم های دفاعی میزبان محسوب می شود(۱۳). سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن(بیماری زا) فرصت طلب و شایعترین عامل بیماری زای انسانی است. این باکتری در افرادی با سیستم ایمنی ضعیف شده مولد عفونت و بیوفیلم است. این باکتری علت اساسی در مرگ و میر مبتلایان به فیبروز سیستیک و نئوپلاسمی و سوختگی های شدید است. اصولا این باکتری یک پاتوژن بیمارستانی بوده و بر طبق CDC شیوع سودوموناس در بیمارستان های آمریکا به طور متوسط ۰/۴ در صد است(۴ در ۱۰۰۰) و تقریبا یک چهارم پاتوژن های بیمارستانی ایزوله ی شمارش شده برای ۱۰/۱ درصد کل عفونت های بیمارستانی حاصل شده است(۱۵و۱۴). دامنه ی بیماری های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در حیوانات متنوع است و انواع: گاو، سگ و گربه، چین چیلا، اسب، ماکیان، گوسفند و بز، مار و خوک، میمون و حیوانات آزمایشگاهی را در بر می گیرد. در حالی که سودوموناس فلورسنس می تواند در میزبانانی نظیر: ماهی، ماکیان، گاو ایجاد بیماری کند. در دهه های اخیر در پی ابداع درمان آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا به دلیل مقاومت ذاتی به اکثرآنتی بیوتیک ها به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن های بیمارستانی شناسایی شد(۱۶و۶).

توانایی تولید رنگدانه در میکروارگانیسم ها، سبب مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به غلظتهای مختلف فلزات سنگین در محیط می گردد. از دلایل مقاومت چندگانه ی استافیلوکوک ها را توانایی آنها در تولید رنگدانه می دانند. رنگدانه در باکتریهای مولد مانند سدی در مقابل نفوذ آنتی بیوتیک از خلال دیواره و غشای سیتوپلاسمی باکتری عمل می کند. سودوموناس دارای چندین عامل حدت بوده که یکی از آنها پیووردین است. سیدروفورها نقش مهمی را در میکروارگانیسم بازی کرده و عامل عمده ی جذب و حمل آهن می باشند. پیووردین PVD عاملی برای ایجاد عفونت و تولید بیوفیلم است. پیووردین یک مولکول سیدروفورگلیکوزیله بوده که ساختار کاتکولات ها را دارد. بر اساس ردیابی ژن های ویرولانس و ژن های کد کننده ی پروتئین های سطحی به عنوان نشانگر حدت و تعیین کننده در ساخت بیوفیلم این باکتری می باشد(۹). در محیط بیمارستان سویه هایی از P. aeruginosa وجود دارند که دارای مقاومت چند گانه(MDR) هستند. این سویه ها از محیط و دست پرسنل جدا شده و همان طور که اشاره شد روشهایی که امروزه جهت شناسایی سودوموناس آئروژینوزا به کار می رود بیشتر بر مبنای خصوصیات فنوتیپی و ظاهری این باکتری شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی وآنتی ژنی است که قادر به شناسایی از طریق ژنوم آن نمی باشند(۱۷).

در بررسی توسط De Meyer و همکاران در سال ۱۹۹۹ که بر روی جدایه های سودوموناس آئروژینوزا اخذ شده از انستیتویی در پاریس از ۸۸ نمونه ی مورد ارزیابی ۴۲٪ دارای ژن های I و *PVD* II و تنها ۱۶٪ دارای ژن *PVD* III بودند که با نتایج حاصل از بررسی ما نیز تفاوت داشته و این موضوع نشان دهنده ی تفاوت در محل جغرافیایی جدایه ها و زیستگاه میکروارگانیسم می باشد(۱۸). در مطالعه توسط Chial و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان شد که آزمایش ها بر روی مدل های موشی صورت گرفته و بیشترین فراوانی را مربوط به ژن *PVD* II(۶۱٪) و کمترین ژن مربوط به PVD III با(۱۴٪) دانسته که با نتایج مطالعات حاضر متفاوت بوده است. این تفاوت می تواند به دلیل تغییر در منابع جمع آوری نمونه های مورد ارزیابی باشد(۱۹). Xu و همکاران در سال ۲۰۰۴ از PCR اختصاصی ژن *oprL* برای شناسایی سریع باکتری سودوموناس آئروژینوزا استفاده کردند و یافتند که PCR ژن لیپوپروتئین غشای خارجی این باکتری در نمونه های بیماران مبتلا به فیبروزسیستیک منجر به شناسایی سریع این باکتری از ریه بیماران می شود که این روش در مقایسه با روش های کشت معمول ۴/۵ ماه سریعتر انجام می گردد(۲۰). در سال ۲۰۰۵ نیز سودوموناس آئروژینوزا از طریق PCR توسط Elfgren و همکاران از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس شناسایی گردید. در این بررسی نمونه ها پس از جدا شدن از بیماران دچار سوختگی از طریق روش های بیوشیمیایی تشخیص و در ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند. فاکتورهای زیادی مثل حضور بازدارنده های PCR در نمونه، شناسایی سلول های زنده و غیره زنده، ویژگی هایی ازقبیل حساسیت(sensitivity) و اختصاصیت(specificity) آغازگر، شناسایی مستقیم یا استفاده از مراحل غنی کننده می توانند بر حساسیت یک روش شناسایی PCR تاثیر بگذارند(۲۱). Cornelis در سال ۲۰۱۰ بیان کردند که نه تنها سنتز دو سیدروفور با تمایلات مختلف وجود دارد که پیوچلین با تمایل کم به جذب آهن و پیووردین PVD با تمایل بالا هر دو پروتئین های اختصاصی جذب کننده ی آهن بوده اما این سیدروفورهای هترولوگ منشا قارچی و باکتریایی نیز دارند. نقش کلیدی سیدروفورها در ذخیره ی آهن برای میکروارگانیسم ها

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

بسیار مهم و شناخته شده است. بسیاری گزارش کردند که سیدروفور، آهن را بیش از سایر فلزات جذب و کلاته می کند. فلزات سنگینی نظیر جیوه قادر به تحریک تولید پیووردین نمی باشند(۹). Schalk و Guillon در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که سودوموناس دارای چندین عامل حدت بیماری بوده که یکی از آنها پیووردین، از سیدروفورهای عمده ی جذب و حمل آهن است. این عامل جهت تسهیل رشد باکتری در میزبان نقش مهمی دارد. پیووردین PVD عاملی برای بیماری زایی و مورد نیاز جهت عفونت و تشکیل بیوفیلم است. پیووردین یک مولکول سیدروفورگلیکوزیله بوده که دارای اساس ساختاری کاتکولات است. سه نوع دیگر سیدروفور ساختار متفاوتی از پیووردین دارند(۱). تقریبا همه ی میکروارگانیسم هایی که قابل کشت هستند به جز لاکتوباسیلوس ها قادر به تولید سیدروفور بوده و در باکتری سودوموناس، پیووردین مهمترین سیدروفوری است که در بیماری زایی و شدت تهاجم این باکتری موثر است. پیووردین ها ساختاری مرکب و پیچیده دارند که در اعضای این خانواده نقش مهمی در توان رقابتی سودوموناس ها داشته و از علل شدت بیماری است که تولید رنگدانه در اکثر میکروارگانیسم ها نیازمند محرک محیطی می باشند. حضور گیرنده این سه کلاس پیووردین(PVD) میان سویه های سودوموناس برای دو گیرنده از نوع پیووردین II و نوع PVDs III ضروری است. به دلیل احتمال وجود سیستم های القاکننده ی تولید PVD توصیه می شود که نتایج با روش دیگری نیز تایید گردد، که می توان از IEF برای سویه های تولید کننده ی پیووردین یا جذب واسطه ی آهن برای سایران استفاده نمود. در نتیجه، شناسایی این سه گیرنده PVD مشخصه ی همه سویه های سودوموناس بوده که تاکنون تست شده و می بایستی کمک به شناسایی آنها در سایر حوزه های تعامل کننده با PVDs مربوطه باشد(۲۲و۵). Ganne و همکاران دریافتند که رهایی آهن از سیدروفور پیووردین در سودوموناس آئروژینوزا تحت تاثیر سه فاکتور FpvC، FpvG و FpvH می باشد(۲۳). Pahlow و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مطالعه خود نشان دادند که از پیووردین می توان در شناسایی سریع سودوموناس آئروژینوزا استفاده نمود و بنابراین به عنوان مارکر تشخیصی در عفونت های سودومونایی مطرح می باشند(۲۴).

از موارد محدودیت انجام کارهای مولکولی می توان به صرفه ی اقتصادی و هزینه ی انجام تست اشاره نمود و نیز بهینه سازی شرایط این قبیل تستهای PCR از اهمیت بالایی برخوردار است. شرایط پرایمر و نحوه ی گزینش آن و نیز حساسیت پرایمر در این تست ها فوق العاده اهمیت دارد. انجام تست مولکولی بر روی نمونه های ارسال شده قدرت تفکیک و شناسایی پارتیکل زنده را ازغیر زنده نداشته و نمی تواند میکروارگانیسم فعال را از غیرزنده جدا نماید. گاهی اوقات کشت نمونه در آزمایشگاه منفی می شود در حالی که انجام PCR و ایجاد باندهای ژنی مثبت مشاهده می گردد.

## نتیجه گیری

نتیجه گیری حاصل از مطالعات این پژوهش، هدف اصلی را بهبود حساسیت PCR در شناسایی ژن های کد کننده پیووردین در باکتری بیماری زا می داند. بسیاری از تحقیقات که بر مبنای PCR روی سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفته بر اساس ردیابی ژن های حدت باکتری از جمله رنگدانه ها مانند پیووردین است که ژن های کد کننده ی پروتئین های سطحی به عنوان عامل تهاجم محسوب می گردد. در این تحقیق فراوانی ژن PVD در جدایه های انسانی و دامی ژن کد کننده ی کلاس ۳ پیووردین بیشترین فراوانی بوده که شایع ترین ژن موجود است و کمترین فراوانی مربوط به کلاس ۲ پیووردین می باشد. پیشنهاد می گردد تا در تست های بعدی هم به بررسی فنوتیپی باکتری پرداخته شود و هم سایر پیگمان ها از نظر قدرت بیماری زایی ارزیابی گردند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه ی دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی استخراج شده است. بدین وسیله از آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند، قدردانی و تشکر می گردد. کد پایان نامه در شورای پژوهشی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، گرایش میکروبیولوژی به شماره ۷۶۴ به ثبت رسیده است.

## منابع

1. Schalk IJ & Guillon L. Pyoverdine biosynthesis and secretion in pseudomonas aeruginosa: Implications for metal homeostasis. Environmental Microbiology 2013; 15(6): 1661-73.

2. Günseren F, Mamıkoğlu L, Öztürk S, Yücesoy M, Biberoğlu K, Yuluğ N, et al. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1999; 43(3): 373-8.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

3. Tasli H & Bahar IH. Molecular characterization of tem-and shv-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based enterobacteriaceae in Turkey. Japanese Journal of Infectious Diseases 2005; 58(3): 162-7.

4. Kucukates E. Antimicrobial resistance among gram-negative bacteria isolated from intensive care units in a cardiology institute in Istanbul, Turkey. Japanese Journal of Infectious Diseases 2005; 58(4): 228-31.

5. Peek ME, Bhatnagar A, Mccarty NA & Zughaier SM. Pyoverdine, the major siderophore in pseudomonas aeruginosa, evades ngal recognition. Available at: https://www.hindawi.com/journals/ipid/2012/843509/. 2012.

6. Saurina G, Quale JM, Manikal VM, Oydna E & Landman D. Antimicrobial resistance in enterobacteriaceae in brooklyn, ny: Epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000; 45(6): 895-8.

7. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, et al. Evaluation of the new vitek 2 extended-spectrum beta-lactamase (esbl) test for rapid detection of esbl production in enterobacteriaceae isolates. Journal of Clinical Microbiology 2006; 44(9): 3257-62.

8. Shah AA, Hasan F, Ahmed S & Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β-lactamases. Research in Microbiology 2004; 155(6): 409-21.

9. Cornelis P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. Applied Microbiology and Biotechnology 2010; 86(6): 1637-45.

10. Lamont IL & Martin LW. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in pseudomonas aeruginosa. Microbiology 2003; 149(4): 833-42.

11. Thai QK & Pleiss J. Shv lactamase engineering database: A reconciliation tool for shv β-lactamases in public databases. BMC Genomics 2010; 11(1): 563.

12. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A & Maguire D. Clinical veterinary microbiology. E-book: Elsevier Health Sciences; 2013: 263-85.

13. De Chial M, Ghysels B, Beatson SA, Geoffroy V, Meyer JM, Pattery T, et al. Identification of type ii and type iii pyoverdine receptors from pseudomonas aeruginosa. Microbiology 2003; 149(4): 821-31.

14. Fazio GG, Hora JL, Allen LE, Ashby MLN, Barmby P, Deutsch LK, et al. The infrared array camera (irac) for the spitzer space telescope. The Astrophysical Journal Supplement Series 2004; 154(1): 10-7.

15. Thai QK, Bös F & Pleiss J. The lactamase engineering database: A critical survey of tem sequences in public databases. BMC Genomics 2009; 10(1): 390.

16. Ritchie BW, Harrison GJ & Harrison LR. Avian medicine principles and application. USA: Wingers Publishing Inc; 1994: 1021.

17. Fallah F, Noori M, Hashemi A, Goudarzi H, Karimi A, Erfanimanesh S, et al. Prevalence of blandm, blaper, blaveb, blaimp, and blavim genes among acinetobacter baumannii isolated from two hospitals of Tehran, Iran. Available at: https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/245162/. 2014.

18. De Meyer G, Audenaert K & Höfte M. Pseudomonas aeruginosa 7nsk2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with pr1a expression. European Journal of Plant Pathology 1999; 105(5): 513-7.

19. Chial BZ, Persoone G & Blaise C. Cyst-based toxicity tests. Xviii. Application of ostracodtoxkit microbiotest in a bioremediation project of oil-contaminated sediments: Sensitivity comparison with hyalella azteca solid-phase assay. Environmental Toxicology 2003; 18(5): 279-83.

20. Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC & Elborn JS. Early detection of pseudomonas aeruginosa–comparison of conventional versus molecular (pcr) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (cf). Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2004; 3(1): 21.

21. Elfgren K, Rylander E, Rådberg T, Strander B, Strand A, Paajanen K, et al. Colposcopic and histopathologic evaluation of women participating in population-based screening for human papillomavirus deoxyribonucleic acid persistence. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2005; 193(3): 650-7.

22. Akya ASH, Khodadoost M & Rashiditabar E. Prevalence of blatem gene in escherichia coli isolated from urinary tract infections of outpatients in Kermanshah. Journal of Zanjan University of Medical Sciences & Health Services 2013; 21(88): 84-94[Article in Persian].

23. Ganne G, Brillet K, Basta B, Roche B, Hoegy F, Gasser V, et al. Iron release from the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa involves three new actors: FpvC, FpvG, and FpvH. ACS Chemical Biology 2017; 12(4): 1056-65.

24. Pahlow S, Stöckel S, Pollok S, Cialla-May D, Rösch P, Weber K, et al. Rapid identification of Pseudomonas spp. via Raman spectroscopy using pyoverdine as capture probe. Analytical Chemistry 2016; 88(3): 1570-7.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 9:58 IRDT on Tuesday August 21st 2018

# Identification of Pyoverdine Gene in the Human and Animal in Pseudomonas aeruginosa Isolates by Multiplex-PCR Method

**Ranjbar Elham[1] (M.S.) - Amini Kumarss[2] (Ph.D.)**

1 Master of Science in Microbiology, Microbiology Department, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

2 Assistant Professor, Microbiology Department, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

## Abstract

**Received: Jun 2017**

**Accepted: Nov 2017**

**Background and Aim:** Pseudomonas aeruginosa is one of the most important factors in hospital infections, especially in patients with immune deficiency and Childhood diseases. The Virulence of bacteria are due to the presence of the Pyoverdine gene, which has many effects on the wild type of bacteria during the pathogenic pathway. Identification of different classes of PVD gene is necessary for the development of prevention and control Diseases program. In this research, the presence of PVD genes in the samples and their effect on pathogenicity was isolated and investigated.

**Materials and Methods:** In the present study 60 Species of P. aeruginosa was isolated from clinical samples of human and animal, after approval by diagnostic tests and differential, were studied. Finally, for every 60 Species, isolated, Multiplex PCR was performed to detect target genes. Multiplex PCR method is to be considered as the gold standard. Its results are more reliable.

**Results:** The results showed that the frequency of PVD gene in human isolates and livestock gene encoding the 3rd Pyoverdine was the highest frequency with 76.6% the lowest frequency is for Pyoverdine class 2 with 46%.

**Conclusion:** As a result, the identification of three type's genes of PVD classes in all strains tested by Pseudomonas could help to identify human patients and livestock with Pseudomonas infection and, given the presence of the genes encoding PVD, has a direct relation to important bacterial pathogenicity.

**Keywords:** Pseudomonas Aeruginosa, Pyoverdine, PCR Multiple

*** Corresponding Author:**
**Amini k;**
**Email:**
**dr_kumarss_amini@yahoo.com**