



## Evaluation of Type IV Pilin Sub Groups in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Environmental Samples, Cystic Fibrosis and Burn Patients

Alireza Salimi Chirani<sup>1</sup>, Hossein Dabiri<sup>1</sup>, Iraj Nikokar<sup>2</sup>, Monireh Ebrahimpour<sup>2</sup>, Farahnoosh Doostdar<sup>1</sup>, Hossein Goudarzi<sup>1</sup>, Fatemeh Fallah<sup>1</sup>, Ali Esmaili<sup>1</sup>

1. Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Laboratory of Microbiology and Immunology of Infectious Diseases, Paramedicine Faculty, Guilan University of Medical Sciences, Guilan, Iran.

### Article Information

**Article history:**

Received:2014/06/15

Accepted:2014/09/15

Available online:2014/11/22

**Article Subject:**

Molecular Microbiology

**IJMM 1393; 8(3): P 1-7****Corresponding author at:****Dr Hossein Dabiri**

Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Email:****hodabiri@gmail.com**

### Abstract

**Background and Aim:** Type IV pilin molecule in *Pseudomonas aeruginosa* with wide functions, has important role in the diversity of the bacterial genome. According to the latest classification, Type IV pilin is divided to two main subtypes; IVa, IVb. The major subunit encoding Type IV pilin subtypes; IVa, IVb is *pilA* and *pilS2* genes respectively which serve as a marker for the detection of the Type IV pilin subtypes. The purpose of the current study was to evaluate the frequency of *pilA* and *pilS2* gene in cystic fibrosis, burns, and environmental isolates.

**Materials and Methods:** The samples for *P.aeruginosa* were collected from cystic fibrosis, burns, and environment wastewater during the April 2013 to December 2013. Samples were cultured and identified using microbial and biochemical methods. DNA of isolates was extracted by commercial kit. PCR was performed using specific primers. Statistical analysis was done using SPSS 17.0 software.

**Results:** A total of 100 *P.aeruginosa* isolates were collected; 30 cystic fibrosis, 30 burn, 40 environmental. The prevalence of the *pilA* gene were 63.3% , 56.7% and 45/2% for cystic fibrosis, for burns and environmental strains . The *PilS2* gene frequency was 57.5% of the environmental isolates, 67.5% of cystic fibrosis strains and 73.3 % of the isolates were burned.

**Conclusions:** Our study showed that the frequency of *P.aeruginosa* T4P major pilin subunits in our *P. aeruginosa* population was high. The incidence of *pilS2* gene was greater than *pilA* and was more frequent in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized burn patients.

**Key Words:** *Pseudomonas aeruginosa*, type IV pilin, Cystic Fibrosis

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Salimi chirani A, Dabiri H, Nikokar I, Ebrahim pour komleh M, Dousdar F, Goudarzi H, et al . Evaluation of type IV pili sub groups in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from environmental samples, cystic fibrosis and burn patients . Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (3) :1-7

## بررسی فراوانی زیرگونه های پیلی نوع چهار سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از منابع محیطی، بیماران فیبروزیس سیستیک و سوختگی

علیرضا سلیمی چیرانی<sup>۱</sup>، حسین دبیری<sup>۱</sup>، ایرج نیکوکار<sup>۲</sup>، منیره ابراهیم پور کومله<sup>۲</sup>، فرحناوش دوستدار<sup>۱</sup>، حسین گودرزی<sup>۱</sup>، فاطمه فلاح<sup>۱</sup>، علی اسماعیلی<sup>۱</sup>

۱. گروه میکروبی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.  
۲. آزمایشگاه میکروبی شناسی و ایمنولوژی بیمارهای عفونی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** پیلی نوع چهار سودوموناس آئروژینوزا با عملکرد های گوناگون، واسطه ای مهم در به وجود آمدن تنوع در ساختار ژنومی باکتری محسوب می شود. بر اساس طبقه بندی رایج، دو زیر گونه IVb و IVa پیلی نوع چهار توسط ژن های *pilA* و *pilS2* که کد کننده زیر واحد های اصلی دو زیر گونه پیلی می باشند سنتز می شوند. هدف این مطالعه بررسی میزان فراوانی ژن های *pilA* و *pilS2* به عنوان شاخص زیر گونه IVb، IVa از پیلی نوع چهار سودوموناس آئروژینوزا در بین سویه های فیبروزیس سیستیک، سوختگی و ایزوله های محیطی می باشد.

**مواد و روش کار:** تعداد ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا در طی فروردین ۱۳۹۲ تا آذر ۱۳۹۲ جمع آوری گردید. ایزوله ها از بیماران فیبروزیس سیستیک، سوختگی و محیطی که از شبکه فاضلاب مرکز مراقبت های سوختگی ایزوله شد، بدست آمد. فرایند PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS۱۷ انجام گرفت.

**یافته ها:** میزان فراوانی ژن *pilA* سودوموناس آئروژینوزا به تفکیک ایزوله ها، ۶۳/۳٪ در سویه های فیبروزیس سیستیک، ۵۶/۷٪ در سویه های سوختگی و ۴۲/۵٪ در سویه های محیطی بود. فراوانی ژن *pilS2* به تفکیک، ۵۷/۵٪ در ایزوله های محیطی، ۶۷/۵٪ در سویه های فیبروزیس سیستیک و ۷۳/۳٪ در ایزوله های سوختگی مشاهده شد.

**نتیجه گیری:** مطالعه ما نشان داد که فراوانی پیلی نوع چهار در بین سویه های سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از منابع مختلف بالا است و زیرگونه IVb از پیلی نوع چهار در مقایسه با زیرگونه IVa در بین منابع مورد مطالعه از فراوانی بالاتری برخوردار می باشد.

**کلمات کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، type IV pilin، سیستمیک فیبروزیس

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۵  
پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۲۴  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۰۹/۰۱  
موضوع:  
میکروبی شناسی مولکولی

IJMM 1392; 8(3): P 1-7

نویسنده مسئول:

دکتر حسین دبیری

گروه میکروبی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تلفن: ۰۲۱۲۳۸۷۲۵۵۶

پست الکترونیک:

[hodabiri@gmail.com](mailto:hodabiri@gmail.com)

### مقدمه

اتصال مانند پیلی نوع چهار، اجزای تشکیل دهنده ماتریکس بیوفیلم و فلاژل باکتری نقش مهمی را در سازگاری، زنده ماندن و پویایی باکتری در زیست گاه های متفاوت بر عهده دارند. در مجموع این قابلیت ها باکتری را قادر می سازد که در گستره وسیعی از طبیعت زندگی کند و در تماس با منابع غنی از قطعات DNA، ترانسفورماتور فاژها، اینتگرون ها و ترانسپوزون ها قرار

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب مهم در بیماران مبتلا به سوختگی، فیبروزیس سیستیک تنفسی و عفونت های مرتبط با ونتیلاتور محسوب می شود (۱، ۲). سودوموناس آئروژینوزا در سیستم های فاضلاب بیمارستانی قادر به کلونیزه شدن بوده و از آنجا می تواند وارد محیط شود (۳). وجود فاکتورهای گوناگون در سودوموناس آئروژینوزا شامل عوامل

قرار دارد. در حقیقت ناحیه tRNA<sup>Thr</sup> یک نقطه داغ (Hot spot) برای یکپارچه سازی و ورود منابع خارجی DNA در کروموزوم سودوموناس آئروژینوزا محسوب می شود (۱۲). زیرگونه b پیلی نوع چهار (T4bP) در سودوموناس آئروژینوزا و باکتری های روده ای مانند انتروهموراژیک /شریشیاکلی، انتروتوکسیژنیک /شریشیاکلی، سالمونلا تیفی سرووار انتریکا و ویبریو کلرا دیده شده است. T4bP در سودوموناس آئروژینوزا بر اساس اجزای دستگاه و اندازه آنها به دو زیرخانواده طبقه بندی می شود. در دسته اول پیلین Pils2 به عنوان زیر واحد اصلی پیلی ایفای نقش می کند و ژن کد کننده آن توسط جزیره بیماریزایی ۱ (PAPI - 1) و یا بر روی پلاسمیدها قرار دارد (۹). در حالت کلی تنوع گسترده ای از مولکول اتصال در سودوموناس آئروژینوزا توسعه بیوفیلم اتصال پایدار باکتری سودوموناس آئروژینوزا را به محیط های متنوع تضمین می کند (۱۳). هر سویه از سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از منابع مختلف محیطی ممکن است عوامل بیماریزایی منحصر به فرد خود از جمله انواع مختلف زیر گونه های پیلی نوع چهارم را کد نماید. در حال حاضر بیش از همیشه با توجه به تنوع ژنومی گسترده در اطراف ژن *pila*، ماهیت متغیر T4bP به عنوان یک عامل اتصال کد شونده توسط جزیره بیماریزایی PAPI - 1 در این تحقیق برای اولین بار بررسی فراوانی انواع مختلف T4P با در نظر گرفتن ژن های کد کننده زیر واحدهای اصلی، *pila* و *pils2* در بین نمونه های جدا شده از بیماران فیبروزیس سیستیک، عفونت های سوختگی و همچنین سیستم های فاضلاب مرکز مراقبت های سوختگی توسط روش ملکولی PCR انجام گرفت.

## مواد و روش ها

### جمع آوری نمونه ها

از مجموع ۱۰۰ سودوموناس آئروژینوزا جدا شده ۳۰ نمونه از کودکان بستری ۰ تا ۱۷ ساله با علائم فیبروزیس سیستیک، ۳۰ نمونه از بیماران سوختگی و ۴۰ ایزوله محیطی از شبکه فاضلاب مرکز مراقبت های سوختگی در مطالعه ما مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ها در طول فروردین ۱۳۹۲ تا آذر ۱۳۹۲ بیش از هشت ماه جمع آوری شدند. برای تعیین هویت باکتری ها از بیماران فیبروزیس سیستیک، خلط بیمار با توجه به سن جمع آوری گردید و پس از آن در محیط های انتخابی مانند بلاد آگار کشت داده شد. در مورد بیماران سوختگی، سواب زخم از بیماران

گیرد. این عوامل سبب به وجود آمدن نا همگونی در ساختار ژنومی سودوموناس آئروژینوزا می گردد (۴). پیلی تیپ چهار (T4P) سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک عامل اتصالی قدرتمند در انواع محیط ها در فرایند اتصال باکتری شرکت می کند. T4P همچنین در بسیاری دیگر از باکتری های گرم منفی مانند نایسریا گونوره، ویبریو کلرا، /شریشیاکلی روده ای نیز یافت شده است. از جمله وظایف T4P می توان به انواع مختلف تحرک در باکتری، تشکیل میکروکلنی جذب DNA و دستگاه انتقال الکترون اشاره نمود (۵، ۶). امروزه این موضوع پذیرفته شده است که انواع مختلفی از T4P سودوموناس آئروژینوزا در پدیده اتصال به موئین، سلول های اپی تلیال و اندوتلیال و همچنین سطوح بی جان مانند شیشه و فولاد ضد زنگ نقش دارد؛ همچنین تشکیل بیوفیلم نیز تحت تاثیر این ملکول پروتئینی قرار دارد، بعد از اتصال و تشکیل بیوفیلم، ریشه کن کردن سودوموناس آئروژینوزا می تواند بسیار دشوار و چالش برانگیز باشد (۷، ۸). این ساختار، پلیمری قوی، انعطاف پذیر و رشته ای متشکل از هزاران مونومر به نام پیلین (pilin) می باشد. در سودوموناس آئروژینوزا T4P به زیر گونه های IVa، IVb، تقسیم می شود (۹). این طبقه بندی بر اساس سیستم های مونتاژ، شباهت در ترادف آمینو اسیدی و تنوع در خواص ساختاری پیلی نوع چهار می باشد. ژن های کد کننده زیر واحد های اصلی در دو زیرگونه پیلی نوع چهار سودوموناس آئروژینوزا، IVb، IVa به ترتیب عبارتند از *PilA*، *Pils2*. در بین گونه های باکتریایی واجد زیر گونه های پیلی نوع چهار، سودوموناس آئروژینوزا تنها گونه ای است که قادر است هر دو زیر گونه پیلی نوع چهار را کد نماید. زیر گونه IVa از نوع چهار سودوموناس آئروژینوزا (T4aP) در طیف گسترده ای از باکتری پاتوژن مانند نایسریا و همچنین در باکتری های محیطی مانند *Deinococcus Myxococcus Thermus*، *Dichelobacter*، *Shewanella* و *Bdellovibrio GM2* و *GM1* یافت می شود. سودوموناس آئروژینوزا به عنوان گیرنده قوی برای لیگاند های GM1 و GM2 انسانی که بیان فراوان در سطح سلول های اپی تلیالی دارند محسوب می شوند (۱۰). در هر مولکول T4aP، خواص چسبنده با منطقه حلقوی در انتهای C- ترمینال (DSL یا D-region) که واجد باند دی سولفید است در ارتباط است (۱۱). در لکوس ژنی *pila* تغییرات چشمگیری در هر دو سطح ژنوتیپی و فنوتیپی دیده می شود. این تغییرات تحت تاثیر ناحیه مجاور این لوکوس ژنی، که کد کننده tRNA آمینو اسید ترئونین (tRNA<sup>Thr</sup>) می باشد

در این مطالعه سودوموناس آئروژینوزا گونه PAO1 به عنوان کنترل مثبت برای آزمون PCR ژن *pilA* (۱۵) و سودوموناس آئروژینوزا گونه PA14 به عنوان کنترل مثبت ژن *pils2* (۹) انتخاب شد. واکنش PCR در حجم کل ۲۵μL حاوی ۲۰۰ میکرو مولار مخلوط dNTPs، ۲/۵ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۲/۵ واحد DNA پلی مراز، 20 پیکومولار از هر پرایمر و ۳۰۰ نانوگرم از DNA الگو در حضور دو جفت پرایمر اختصاصی برای هر یک از دو ژن *pilA* و *pils2* بعد از جداسازی مورد استفاده قرار گرفت. فرایند PCR برای ۳۵ دوره متشکل از یک مرحله دناتوراسیون اولیه در C ۹۵ به مدت ۱۵ دقیقه برای هر سه ژن طراحی گردید. برنامه PCR برای ژن *pilA* به صورت یک مرحله دناتوراسیون اولیه در C ۹۵ به مدت ۱۵ دقیقه، دناتوراسیون ثانویه در C ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه، C ۵۴ برای تکثیر محصول PCR به مدت ۴۵ ثانیه، C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه برای اتصال پرایمر و مرحله نهایی C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه تعریف شد. برای ژن *pils2* مرحله دناتوراسیون ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه در C ۹۵ انجام شد. جهت فرآیند اتصال پرایمر مراحل در دمای C ۶۰ به مدت ۴۵ ثانیه اتخاذ گردید. برای فرایند سنتز دمای C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه استفاده شد. محصولات PCR با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز برای مشخص نمودن باند های احتمالی آنالیز گردید (شکل ۱). محصولات PCR با استفاده از کیت خالص سازی PCR (Bioneer Co., Korea) و تعیین توالی هر دو رشته Forward و هم Reverse توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. نتایج تعیین توالی با Chromas 1.45 و MEGA-4 نرم افزار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و BLAST سکانس ها با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری نیز با استفاده از نرم افزار SPSS 17.0 (IBM) انجام گرفت.

#### یافته‌ها

از مجموع ۱۰۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده، ۴۰ نمونه محیطی، ۳۰ نمونه جدا شده از بیماران سوختگی و ۳۰ نمونه مربوط به فیبروزیس سیستیک بودند. به طور کلی میزان فراوانی ژن *pilA* سودوموناس آئروژینوزا در ۵۳ (۵۳٪) از کل نمونه ها مشاهده گردید، در حالی که این مقدار برای ژن *pils2* ۶۵ (۶۵٪) بود

با علائم و نشانه های عفونت زخم سوختگی بالینی جمع آوری شد و به محیط TSB، همچنین بلاد آگار و McConkey آگار منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. نمونه برداری از شبکه فاضلاب مرکز مراقبت های سوختگی بدین صورت انجام گرفت که پس از ریختن ۴۰۰ میلی لیتر فاضلاب به بطری های دهانه گشاد Nalgene کاملاً استریل حاوی ۱/۰٪ تیوسولفات سدیم (۳٪ محلول) در نقاط نمونه برداری منتقل و با رعایت زنجیره سرد آزمایشگاه برای تجزیه و تحلیل های لازم فرستاده شد. نمونه های فاضلاب به میزان ۱۰۰ میلی لیتر از غشاء هایی با تخلخل ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد. نمونه ها بر روی McConkey آگار کشت داده شدند. پس از ۲ روز انکوباسیون در C ۳۷، کلنی ها بر اساس روش های استاندارد باکتری شناسی مانند رنگ آمیزی گرم، تحرک، مورفولوژی، تست کاتالاز و خصوصیت اکسیداز مثبت، تست (O/F) اکسیداسیون - تخمیر و همچنین لاکتوز منفی بودن انجام گرفت. آزمون رشد در C ۴۲ و قابلیت تولید رنگدانه نیز بررسی شد. در خاتمه بعد از تعیین هویت نمونه ها در بلاد آگار محتوی ۵٪ خون گوسفند برای یک دوره انکوباسیون تحت دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت شد. تمام نمونه ها در مدت ۲۴ ساعت پس از جمع آوری مورد بررسی و آزمایش قرار گرفت. تمام گونه ها در محیط کشت سوپا Tryptic soy broth (TSB) دارای ۳۰٪ گلیسرول در ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

#### استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمرز

به منظور استخراج DNA، سویه های جدا شده از نمونه ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای C ۳۷ در محیط لوریا برتانی (LB) کشت شد. DNA مربوط به ۱۰۰ سویه جدا شده از نمونه ها توسط کیت استخراج DNA با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. (QIAamp DNA mini kit, QIAGEN, Hilden, Germany)

در مطالعه ما از روش PCR برای بررسی توزیع ژن های *pilA* و *pils2* که به ترتیب کد کننده پیلی های نوع IVa و IVb می باشد استفاده گردید. توالی پرایمر برای *pilA* از مقالات گذشته انتخاب و صحت آن بررسی گردید (۴). برای ژن های *pils2* پرایمر ها برای اولین بار در این مطالعه با استفاده از نرم افزار primer طرحی شدند.

جدول ۱ سکانس نوکلئوتیدی پرایمر های Forward و Reverse ژن های *pilA* و *pilS2* از زیر گونه های پیلی نوع چهار

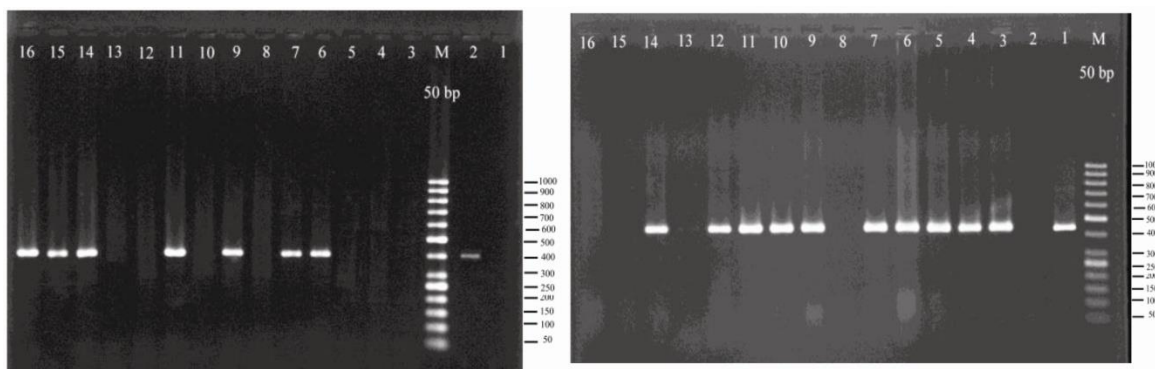
| نام پرایمر   | توالی الیگونوکلئوتید (۵' - ۳')   | طول محصول PCR (bp) | مرجع          |
|--------------|--|--------------------|---------------|
| <i>pilA</i>  | Reveres, 5'- TCG AAC TGA TGA TCG TGG -3'<br>Forward 5'- CTT TCG GAG TGA ACA TCG -3'        | ۴۰۸                | ۴             |
| <i>pilS2</i> | Reverse: 5'- GGT CAC TTC TCC GGT GAT CG -3'<br>Forward: 5'- GCG GTT TCG TTT CCA TCG AG -3' | ۴۲۸                | در این مطالعه |

ایزوله شده ۳۴٪ از آنها واجد هر دو ژن *pilA* و *pilS2* بودند. فقط ۱۶ ایزوله از بین ۱۰۰ سویه جدا شده از نظر ژن های *pilA* و *pilS2* منفی بودند؛ ۱۰ نمونه مربوط به نمونه های محیطی، ۳ نمونه از فیروزیس سیستمیک و ۳ نمونه از ایزوله های ایزوله شده از بیماران بودند. در میان تمام ایزوله ها کمترین فراوانی مربوط به ژنوتایپ  $pilA^+pilS2^+$  (۰.۲٪) بود (جدول ۲).

#### بحث

توانایی بقا و زندگی در شرایط متنوع زیست محیطی و قدرت سازش بالا، سودوموناس آئروژینوزا را در معرض مجموعه بزرگی از قطعات DNA و ترانسفورماتور های مختلف ژنومی از جمله فاژها، اینتگرون ها، ترانسپوزون ها و عناصر دیگر قرار می دهد (۴). سیستم های آبی و فاضلابی بیمارستان ها و همچنین محیط های بالینی مرطوب به طور مکرر با کلونیزه شدن توسط سویه های سودوموناس آئروژینوزا همواره خطری برای محیط های اجتماعی محسوب می شود (۱۴). از فاکتورهای مهم کلونیزه شدن، پیلی تیپ چهار سودوموناس می باشد. سویه های سودوموناس آئروژینوزا قادرند دو نوع پیلی قطبی نوع چهار به نام های T4aP، T4bP را بیان نمایند. در میان گستره وسیعی از پاتوژن های گیاهی، حیوانی و پاتوژنهای انسانی و همچنین میکروارگانیسم های محیطی دیده می شود. T4bP دارای تنوع بیشتر و گسترده ای فراتر از T4aP می باشد.

بر این اساس، مطالعات نشان داد که فراوانی ژن *pilA* در ۱۷ نمونه (۲/۴۵٪) از ایزوله های زیست محیطی، ۱۹ نمونه (۶۳/۳٪) از نمونه فیروزیس سیستمیک و ۱۷ ایزوله (۵۶/۷٪) از بیماران سوختگی مثبت گزارش شد. (P value = ۰/۲). ژن *pilS2* در ۲۳ مورد (۵۷/۵٪) از ایزوله های محیطی ۲۰ ایزوله (۶۷/۵٪) از فیروزیس سیستمیک و ۲۲ نمونه (۷۳/۳٪) از نمونه ها مبتلا به سوختگی (p value = ۰/۳۷۰) مشاهده شد. با در نظر گرفتن ژنوتایپ  $pilA^-pilS2^-$  میزان فراوانی زیست محیطی این ژنوتایپ (۲۵٪) بالاتر از فیروزیس سیستمیک (۱۰٪) و ایزوله های بدست آمده از بیماران سوختگی (۱۰٪) بودند. ارتباط آماری معنی دار ضعیفی بین ژنوتایپ  $pilA^-pilS2^-$  و منبع نمونه (مقدار  $P= ۰/۰۹$ ) وجود دارد. در این مطالعه اگر چه درصد فراوانی ژنوتایپ  $pilA^+pilS2^+$  در نمونه های فیروزیس سیستمیک و سویه های بدست آمده از نمونه های سوختگی ۱۲ (۴۰٪) بوده و نسبت به نمونه های جدا شده از محیط ۱۰ (۲۵٪) بالاتر بود، اما هیچ ارتباط معنی داری از لحاظ آماری بین الگوی ژنوتایپی و منشأ نمونه گیری وجود نداشت (p value < ۰/۰۵). نتایج مطالعه نشان داد میزان فراوانی ژنوتایپ  $pilA^+pilS2^-$  را در نمونه های فیروزیس سیستمیک ۷ (۲۳/۳۲٪)، در سویه های سوختگی ۵ (۱۶/۳۳٪) و در ایزوله های بدست آمده از نمونه های محیطی ۷ (۱۷/۰۵٪) بود. از میان ۳۰ نمونه فیروزیس سیستمیک ژنوتایپ  $pilA^-pilS2^+$  در ۸ مورد (۲۶/۶۶٪) و در سویه های سوختگی ۱۰ (۳۳/۳۳٪) مشاهده شد اما این رقم در نمونه های محیطی ۱۳ (۳۲/۵٪) و از دو گروه دیگر بیشتر بود. از میان ۱۰۰ سویه



شکل ۱: سمت راست: نتایج ژل الکتروفورز حاصل از PCR ژن *pilA* از زیرگروه IVa پیلای تیپ چهار سودوموناس آئروژینوزا نمونه های فیبروزیس سیستمیک؛ ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون M: مارکر ۵۰ جفت بازی DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo scientific). ۳-۱۶ محصولات PCR ژن *pilA* (۴۰۸ جفت باز). سمت چپ: نتایج ژل الکتروفورز حاصل از PCR ژن *pilS2* از زیرگروه IVb پیلای تیپ چهار سودوموناس آئروژینوزا نمونه های سوختگی؛ ستون M: مارکر جفت بازی DNA، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی، ستون های ۳-۱۶: نتایج حاصل از PCR ژن *pilS2* (۴۲۸ جفت باز).

جدول ۲: لگوی زیر گونه های پیلای نوع چهار در ایزوله های جدا شده از نمونه های محیطی، بیماران فیبروزیس سیستمیک و سوختگی

| ژنوتایپ  | نمونه ها  |                  |             |          |
|--|-----------|------------------|-------------|----------|
|  | محیطی     | فیبروزیس سیستمیک | سوختگی      | مجموع    |
| <i>pilA</i> <sup>+</sup> , <i>pilS2</i> <sup>+</sup> | ۱۰ (/۲۵)  | ۱۲ (/۴۰)         | ۱۲ (/۴۰)    | ۳۴ (/۳۴) |
| <i>pilA</i> <sup>+</sup> , <i>pilS2</i> <sup>-</sup> | ۷ (/۱۷/۵) | ۷ (/۲۳/۳۲)       | ۵ (/۱۶/۳۳)  | ۱۹ (/۱۹) |
| <i>pilA</i> <sup>-</sup> , <i>pilS2</i> <sup>+</sup> | ۵ (/۳۲/۵) | ۸ (/۲۶/۶۶)       | ۱۰ (/۳۳/۳۳) | ۳۱ (/۳۱) |
| <i>pilA</i> <sup>-</sup> , <i>pilS2</i> <sup>-</sup> | ۱۰ (/۲۵)  | ۳ (/۱۰)          | ۳ (/۱۰)     | ۱۶ (/۱۶) |

فراوانی بدست آمده در مطالعه حاضر اختلاف معنی داری دارد. این تفاوت ممکن است به دلیل تنوع جغرافیایی سویه ها، تعداد نمونه ها و یا روش های تشخیصی باشد. در مطالعه ای دیگر Finnan و همکاران در سال ۲۰۰۴ در کشور ایرلند به بررسی فراوانی *pilA* سودوموناس آئروژینوزا بالینی و محیطی به دو روش PCR و ساترن بلات پرداخت. او میزان فراوانی ژن *pilA* را در بین ۱۶ نمونه ۳۷/۵٪ اعلام نمود که با نتایج این مطالعه تفاوت مختصری را نشان می دهد (۴). مطالعات انجام گرفته به برهمکنش سودوموناس آئروژینوزا با سلول میزبان و یا سطوح بی جان این امر را اثبات نمود که سودوموناس آئروژینوزا دارای توانایی بسیار بالایی برای اتصال به سطوح و یا سلول های میزبان می باشد (۷، ۸، ۱۳).

تا به امروز تکنولوژی نقشه برداری از ژنوم ارگانیسم ها، حضور چندین ژن کد کننده پیلای نوع IV در گونه های سودوموناس آئروژینوزا را تایید نموده است (۱۰). در مقایسه با مطالعات کمی که در باره شیوع پیلای نوع IVa وجود دارد

مطالعات گذشته به بررسی تنوع ژنتیکی سکانس ژنی *pilA* از زیر واحد اصلی T4aP پرداخته اند (۱۵-۱۷) اما تا به امروز مطالعه ای مبنی بر مقایسه و بررسی T4aP، T4bP از زیر گونه از پیلای نوع چهار در میان سویه های سودوموناس آئروژینوزا صورت نگرفته است. در سال های اخیر اهمیت گروه دیگر از T4P به نام T4bP که در ارتباط با جزیره بیماریزایی PAPI-1 و پلاسمید pKLC102 می باشد، بیشتر از قبل مشخص گشته است (۱۲، ۱۸). در مطالعه حاضر میزان فراوانی کلی ژن کد کننده زیر واحد اصلی تشکیل دهنده T4aP، *pilA* (۵۳٪) مطابق با نتایج Morales-Espinosa R و همکاران در سال ۲۰۱۱ از کشور مکزیک بود (۱۲). آنها با در نظر گرفتن بخشی از ژن *pilA* به عنوان سکانس هدف، با استفاده از روش هیبریداسیون، فراوانی ۵۵٪ را برای ژن *pilA* گزارش کردند که از نظر آماری نزدیک به نتایج بدست آمده توسط روش PCR در مطالعه حاضر می باشد. با این حال هنگامی که آنها تمام لکوس ژنی *pilA* را مورد مطالعه قرار دادند میزان فراوانی ۹۸٪ را ثبت نمودند که در مقابل میزان

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی پیلی نوع چهارم در بین سویه های سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از منابع بالینی و محیطی مختلف بالا است. از آنجایی که زیرگونه IVa در انواع فرایند های باکتری به ویژه تولید و شکل گیری بیوفیلم شرکت می کند شیوع نسبتاً بالای آنها نشان دهنده میزان بالای بیماری زایی سویه های مورد مطالعه ایرانی می باشد. ژن *pilS2* که برای اولین بار در این مطالعه به عنوان یک مارکر تشخیصی زیرگونه IVb پیلی نوع چهارم سودوموناس معرفی شده است، در مقایسه با ژن *pilA* در بین منابع مورد مطالعه به ویژه سویه های بدست آمده از بیماران سوختگی از فراوانی بالاتری برخوردار بود. سویه های واجد این زیرگونه از پیلی نوع چهارم می توانند مستعد به دریافت قطعات DNA خارج کروموزومی به ویژه جزیره بیماریزایی ۱ سودوموناس آئروژینوزا و فرایند کونژوگیشن باشند. در نتیجه، این تغییرات میتواند بر پاتوژنز بالای این باکتری تاثیرگذار باشد.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند تا از بدین وسیله از گروه میکروب شناسی و معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تقدیر و تشکر نمایند.

#### تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

اطلاعات دقیقی در مورد شیوع *pilS2* یا مقایسه آنها در سویه های جدا شده از زیستگاه های مختلف وجود ندارد.

مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی پیلی نوع چهارم در بین سویه های سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از منابع مختلف (۷۵٪) در نمونه های محیطی، ۹۰٪ در سویه های فیروزیس سیستیک و ایزوله های سوختگی) بالا است و زیرگونه IVb از پیلی نوع چهارم (۶۵٪) در مقایسه با زیرگونه IVa (۵۳٪) جزو فراوان ترین نوع در بین سویه های محیطی و بالینی می باشد. حضور ژن *pilA* در سویه های بدست آمده از فیروزیس سیستیک (۶۳٪) در مقایسه با ایزوله های سوختگی (۵۶٪) و محیطی (۴۲٪) با بالاتر بود. فراوانی ژن کد کننده زیر واحد اصلی زیرگونه IVb از پیلی نوع چهارم، *pilS2* در ایزوله های بدست آمده از نمونه های سوختگی (۷۳/۳۳٪) در مقایسه با دو منبع دیگر، سویه های محیطی (۵۷/۵٪) و فیروزیس سیستیک (۶۶/۶٪) آمار بیشتری را نشان داد. میزان حضور هم زمان دوزیر گونه پیلی نوع چهارم با ژنوتایپ *pilA<sup>+</sup>pilS2<sup>+</sup>* در سویه های جدا شده از بیماران فیروزیس سیستیک (۴۰٪) و ایزوله های بدست آمده از نمونه های سوختگی (۴۰٪) در مقایسه با ایزوله های بدست آمده از محیط (۲۵٪) بالا تر بود. از آنجایی فراوانی ژن *pilS2* برای اولین بار در بین ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بررسی می شود هنوز اطلاعاتی برای مقایسه با اطلاعات این تحقیق وجود ندارد.

## References

- Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microb Ecol*. 2014;68(1):1-12.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect / Institut Pasteur*. 2000;2(9):1051-60.
- Kelsey M. *Pseudomonas* in augmented care: should we worry? *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(12):2697-700.
- 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.
- Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(5):363-78.
- Pellic V. Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol*. 2008;68(4):827-37.
- Stanley PM. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can J Microbiol*. 1983;29(11):1493-9.
- Stone JH, Gabriel MM, Ahearn DG. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to inanimate polymers including biomaterials. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1999;23(1):713-7.
- Carter MQ, Chen J, Lory S. The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. *J Bacteriol*. 2010;192(13):3249-58.
- Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66:493-520.
- Lee KK, Sheth HB, Wong WY, Sherburne R, Paranchych W, Hodges RS, et al. The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol Microbiol*. 1994;11(4):705-13.
- Morales-Espinosa R, Soberon-Chavez G, Delgado-Sapient G, Sandner-Miranda L, Mendez JL, Gonzalez-Valencia G, et al. Genetic and phenotypic

- characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. PLoS one. 2012;7(5):e37459.
13. Ramsey MM, Whiteley M. *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. Mol Microbiol. 2004;53(4):1075-87.
  14. Schwartz T, Volkmann H, Kirchen S, Kohnen W, Schon-Holz K, Jansen B, et al. Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. FEMS Microbiol Ecol. 2006;57(1):158-67.
  15. Kus JV, Tullis E, Cvitkovitch DG, Burrows LL. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. Microbiology. 2004;150(5):1315-26.
  16. Castric PA, Deal CD. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* pili based on sequence and B-cell epitope analyses. Infect Immun. 1994;62(2):371-6.
  17. Spangenberg C, Fislage R, Sierralta W, Tummler B, Romling U. Comparison of type IV-pilin genes of *Pseudomonas aeruginosa* of various habitats has uncovered a novel unusual sequence. FEMS Microbiol Lett. 1995;125(2-3):265-73.
  18. Klockgether J, Wurdemann D, Reva O, Wiehlmann L, Tummler B. Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2007;189(6):2443-59.