



Investigating the Presence of Type IV Pilin Subgenus in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Cystic Fibrosis, Burns and Environmental Samples

Fatemeh Sameni¹ , Mehrnaz Shahbeik¹ , Hossein Dabiri^{2*}

1. Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

CrossMark
click for updates

Article Information

Article Subject:

Medical Bacteriology



10.30699/ijmm.13.3.164

Corresponding author:

Hossein Dabiri,

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

Email:

hodabiri@gmail.com

Use your device to scan and read the article online



Abstract

Background and Aims: The type IV Pilin is an important colonization factor for opportunistic pathogens of *Pseudomonas aeruginosa*, which plays a role in the formation of biofilms and binding to the host cells. Each type of Pilin is coded with a particular auxiliary gene. This specific relationship can be used as a therapeutic target for detecting *P. aeruginosa* strains as well as its molecular classification. The purpose of this study was to evaluate the frequency of different types of auxiliary genes in cystic fibrosis, burns, and environmental samples.

Materials and Methods: *Pseudomonas aeruginosa* samples were collected from patients with cystic fibrosis, burns as well as environmental wastewaters during 2016-2017. Samples were cultured and identified using standard microbial and biochemical methods. DNA extraction was performed by boiling and PCR was performed through specific primers.

Results: Totally, 90 isolates of *P. aeruginosa* samples (35 environmental, 30 burns, and 25 cystic fibrosis) were examined. *tfpO* and *tfpZ* were positive in 71 and 2 isolates, respectively.

Conclusion: The results indicated that *Pseudomonas aeruginosa* Pilin types are very diverse. Regardless of the source of the samples, the most common *tfp* was *tfpO*. Taking into account the fact that *tfpZ* was found only in burns, it can be assumed that this particular type may appear in severe clinical conditions. Ultimately, larger statistical population and use of more comprehensive typing methods is suggested for better results.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Type IV Pilin, Cystic fibrosis

Received: 2019/05/14

Accepted: 2019/08/24

Available online: 2019/08/24

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Sameni N, Shahbeik M, Dabiri H. Investigating the Presence of Type IV Pilin Subgenus in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Clinical and Non-Clinical Samples. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (3) :164-174

Download citation:

[BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:

[Mendeley](#) [Zotero](#) [RefWorks](#)

Introduction

Pseudomonas is a Gram-negative, aerobic, non-spore forming, oxidase positive, catalase positive bacteria belonging to the family Pseudomonadaceae (1). *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen among cystic fibrosis and burnt patients and can be colonized in hospital sewage systems and enter the environment (2). The pathogenesis of *P. aeruginosa* is due to the production of several cellular and extracellular virulence factors. The cellular factors include flagellum, pyocyanin, fimbria and lipopolysaccharide, and pili, among which bacterial type IV pilus (Tfp) is one of the most important and necessary factors for multiple cellular functions, including biofilm formation, surface motility, host-cell binding, adhesion, cell signaling, DNA uptake by natural transformation (3). Two models of O-glycosylation systems have been found in *P. aeruginosa*. In the first model, glycosylation happens through TfpO (Pil O). The Pil O is an Oligo-saccharyl-transferase that transfers an antigen-O unit to the serine amino acid placed at the C-terminal of the group I pilins. The second pilin glycosylation system in *P. aeruginosa* was found in strains IV, Pa5196 and Pa7, which lacked TfpO (6). *P. aeruginosa* has been separated into five groups according to the presence or absence of varying downstream accessory genes adjacent the pilin gene, pilA. The PilA pilins have different lengths, amino acid sequences and posttranslational modifications.

The first recognized groups are groups I and II. Strains PA01, PAK, and PA103 express group II pilins. Spangenberg and colleagues showed that Type III polymorphism has 173 amino acids, which is taller than the prior pilins, and an open-ended read-only template with undefined function, now called TfpY, which lies under the PilA gene. More isolates with group III alleles, as well as isolates with 2 new pilin alleles (groups III and IV), were found in more than 300 strains of *P. aeruginosa*. The strains of the group V pilin express the auxiliary pilin and protein (Tfp Z) as group III. The group IV pilin consists of two isolates (Pa97, Pa5196) that code the TfpW and TfpX auxiliary proteins at the downstream of the PilA4 (9).

Considering that type IV pilin is one of the most important structures of *P. aeruginosa*, its

presence and variation may contribute to the pathogenesis of the isolates possessing it. This pilin may also act as a new target for antibiotic therapy which has been recently very challenging worldwide (10-12). Hence we aimed to study the presence of type IV pilin subtypes among *P. aeruginosa* isolates from three different sources; hospital waste water, burnt and cystic fibrosis patients.

Material and Methods

Totally, 90 isolates of *P. aeruginosa* strains; 35 from environmental samples, 30 from burnt patients and 25 from cystic fibrosis children referred to Mofid Hospital of Tehran, Iran, were isolated from November 2015 to December 2016. Sampling was done under sterile conditions and the samples were immediately transferred to the laboratory of Shahid Beheshti University of Medical Sciences at the Faculty of Medicine. Sputum specimens of patients with cystic fibrosis were inoculated into McCanky agar and blood agar medium and incubated at 37°C for 24 hours. Finally, the isolates were identified as *P. aeruginosa* using microbial and biochemical methods such as oxidase and catalase, TSI and OF, and growth at temperatures of 4 and 41°C, as well as characteristics such as a pigment and odor production. The standard strain of *P. aeruginosa* PAO1 was used as control. *P. aeruginosa* samples isolated from burnt and cystic fibrosis patients and the environment isolates were stored in TSB containing 30% glycerol at -70°C until further investigation.

DNA extraction and polymerase chain reaction

For DNA extraction of the isolates, the boiling technique was applied. For this purpose, 200 ml of sterilized water was added into the micro-tube and 3-4 fresh colonies (24 hour growth) were dissolved in water and the suspensions were kept at 100°C for 10 minutes, after which centrifugation at 10,000 rpm was done for 5 minutes, and the supernatant containing DNA was transferred to the new microtube for PCR. In this study, the presence of the genes encoding two subtypes of type IV pilin including TfpO and TfpZ genes were investigated by PCR method using specific primers listed in

Table 1. The PCR reaction was done in a volume of 25 µL and performed as (Amplicon, Iran) 12.5 µL Master Mix 1x buffer, 0.5 µL of each primer with concentration of 10 mM, 300 ng/L DNA, and 4 µL deionized distilled water. After preparation of PCR

reaction reagents, the microtubules were placed in a Thermocycler machine (Bio Intellectica, Canada). The program for each gene amplification is summarized in Table 2.

Table 1. Nucleotide sequence of the primers of TfpO, TfpZ genes of the type IV pilin.

Primer	Oligonucleotide sequence (3'-5')	Product length (bp)	Reference
<i>TfpO</i>	Forward 5'- CGTAGGGCTTGCACTGCTAT-3'	363	in this Study
	Reverse 5'-AAGAACCCTCCCAACACGAC-3'		
<i>TfpZ</i>	Forward 5'- AGATTAGGGCGTTCGCTGTT-3'	464	in this Study
	Reverse 5'- CCGCAGGACATCCATTAGCA-3'		

Table 2. PCR program for, TfpO and TfpZ Gene amplification.

Gene	TfpO		TfpZ	
	Temperature	time	Temperature	time
Initial denaturation	95	15 m	95	15 min
denaturation	95	30 s	95	30 s
Connection	72	30 s	72	1 min
Elongation	58	30 s	60	45 s
Final elongation	72	7 m	72	7 min
Cycle	35	35	35	35

After the PCR reaction, electrophoresis of the PCR products was performed on a 1.5% agarose gel containing safe staining dye and recorded by Gel Documentation (Figures 1 and 2). PCR products were sequenced bi-directionally (the Bioneer Co., Korea) and results were analyzed using the NCBI database. Statistical analysis was performed using SPSS 23 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

Results

Out of the 90 *P. aeruginosa* isolates, 72 (80%) possessed the TfpO gene. The results of electrophoresis are shown in Figures 1 and 2. Based on the differentiation of the studied groups, the frequency of the TfpO gene in each group was as follows;

Among the 35 environmental samples, 31 strains (88.57%) had TfpO gene and 4 samples (11.42%) were recognized as negative for this gene. Out of the 25 samples from cystic fibrosis, 17 strains (68%) had TfpO gene and 8 samples (32%) did not possess this gene. Among the 30 isolates from burnt patients, 24 (80%) had TfpO gene, whilst 6 (20%) isolates did not have this gene (Figure 1).

The TfpZ gene was positive in 2 (2.2%) out of 90 isolates, regardless of the source of isolates and 88 (97.8%) isolates lacked this gene. The TfpZ gene was negative in isolates from environmental samples as well as patients with cystic fibrosis. Two (6.66%) positive strain for TfpZ belonged to isolates from burnt patients ($P>0.05$) (Figure 2).



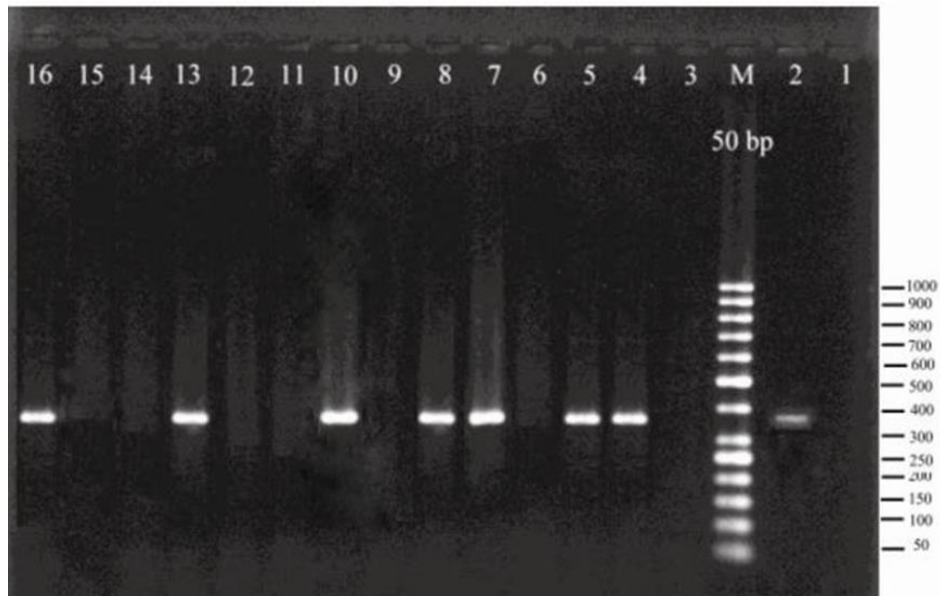


Figure 1. Electrophoresis results of the TfpO gene among *P. aeruginosa* isolates (363bp). Lane 1, negative control; lane 2, positive control; M: size marker of 50 bp, lanes 3-16 PCR products of the TfpO.

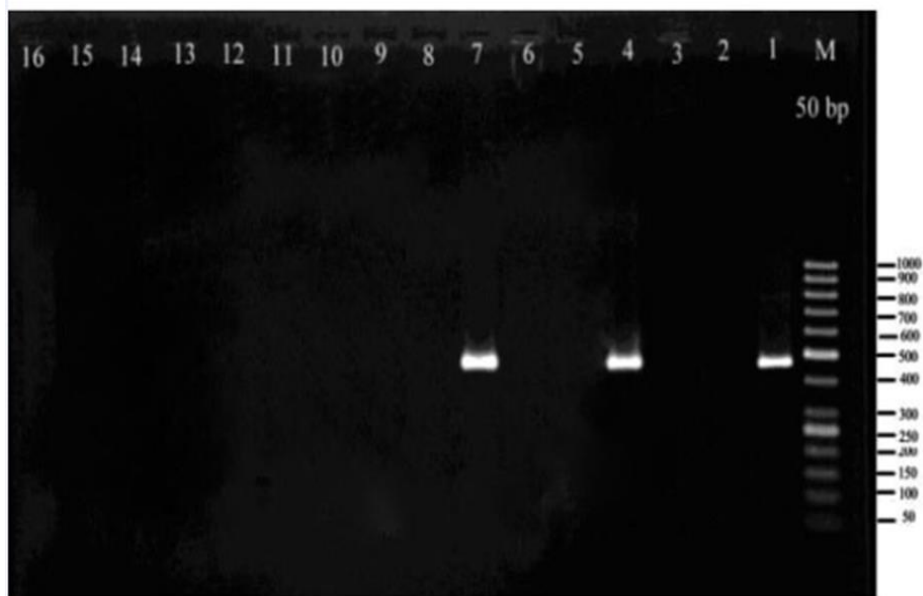


Figure 2. Electrophoresis results of the TfpZ gene of our *P. aeruginosa* isolates (364bp). Lane 1, positive control; lane 2, negative control; M: size marker of 50 bp, lanes 3-16 PCR products of TfpZ gene.

Discussion

High adaptability, colonization and survival of *P. aeruginosa* is due to its massive sets of chosomal and non-chromosome DNA fragments and genome-modifying factors such as bacteri-

ophages, integrons, transposons, and other elements (13). *P. aeruginosa* is colonized on different surfaces and the type IV pilin is one of the important factors for colonization. It has now been accepted that *P. aeruginosa* is able to express three distinct

types of pilin subtypes IVa, IVb and Tad. (14). The IVa type is the most common pilin type in bacteria that grow in laboratories.

To our knowledge, no study has so far been conducted on the comparison of the frequency of type IV pilin in strains and populations of *P. aeruginosa*, and only limited studies have been done on genomic diversity and frequency of IVa pilin subtypes (15-17).

Therefore, the present study was conducted to investigate the presence of IV pilin sub types by PCR among the *P. aeruginosa* community isolated from burnt and cystic fibrosis patients, as well as in the sewage system of the burn centers. According to the results, a high percentage of *P. aeruginosa* strains isolated from different sources in this study were group I of type IV (TfpO). Subsequently, 68% of the samples isolated from patients with cystic fibrosis had this type of type IV. This finding suggests that strains from environment and burnt patients are more closely related to strains isolated from cystic fibrosis patients. In 2004, Kus *et al.* found that the prevalence of TfpO in *P. aeruginosa* strains was more than other groups of type IV pilin (7). According to Kus *et al.* in 2008, the prevalence of TfpO among cystic fibrosis patients, other clinical samples, and the environmental samples were 69.7%, 30.5%, and 58.3% respectively; which compared to our results, showed a higher prevalence among clinical samples (18). Also Deligiann *et al.* in 2010 observed that the prevalence of TfpO in cystic fibrosis isolated *P. aeruginosa* was more than other groups and that it was associated with bacterial colonization (19). Based on the study of Pirnay *et al.* in 2009, the frequency of TfpO in cystic fibrosis isolated *P.*

aeruginosa was 55.8%, which is somewhat above the average (48.2%) (20), but contrary to our study an association between TfpO and cystic fibrosis was not observed. In this study, group V pilin type IV (TfpZ) was only observed in 6.66% of the samples from burnt patients, and the other isolates did not possess this group of type IV pilin.

Conclusion

Overall, our study showed that the prevalence of group I type IV pilin (TfpO) was high in the population of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burnt and cystic fibrosis patients, as well as environmental samples. Since type IV pilin is involved in a variety of bacterial processes, especially in post-translational modification (pili glycosylation) and biofilm formation, their relatively high prevalence indicates a high level of virulence among the Iranian strains of *P. aeruginosa* studied. Based on the studies and the results obtained, we recommend that further studies with an increased number of samples, a more diverse society, involving more genotypic and phenotypic characteristics of type IV pilin subtypes.

Acknowledgements

Great thanks to the Department of Microbiology of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, for the support and providing the facilities for this work.

Conflict of Interest

The authors reported no conflict of interest.





بررسی حضور ژن‌های فرعی پیلی تیپ چهارم در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزاى جدا شده از نمونه‌های بالینی و غیر بالینی

فاطمه ثامن^۱، مهرناز شاهبیک^۱، حسین دبیری^{۲*}

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: پیلی تیپ IV یک فاکتور کلونیزاسیون مهم برای پاتوژن فرصت‌طلب، سودوموناس آئروژینوزا است و در شکل‌گیری بیوفیلم و اتصال به سلول‌های میزبان نقش دارد. هر تیپ پیلی با یک ژن کمکی خاص کد می‌شود. از این رابطه مشخص می‌توان به عنوان هدفی درمانی برای تشخیص سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا و همچنین تیپ‌بندی مولکولی آن استفاده کرد. هدف این مطالعه، ارزیابی فراوانی تیپ‌های مختلف ژن‌های کمکی در نمونه‌های سیستمیک فیبروزیس (CF)، سوختگی و محیطی است.

مواد و روش کار: نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا از بیماران CF، سوختگی و همچنین پسماندهای محیطی از انتهای سال ۹۴ تا انتهای سال ۹۵، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبی و بیوشیمیایی کشت داده و شناسایی شدند. استخراج DNA توسط جوشاندن و PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

یافته‌ها: روی هم رفته ۹۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا (۳۵ نمونه محیطی، ۳۰ نمونه سوختگی و ۲۵ نمونه CF) بررسی شد. *tfpO* و *tfpZ* به ترتیب در ۷۱ و ۲ ایزوله مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج به دست آمده، تیپ پیلی سودوموناس آئروژینوزا بسیار متنوع است. صرف‌نظر از منبع نمونه‌ها، شایع‌ترین *tfp*، *tfpO* بود. با در نظر گرفتن این واقعیت که *tfpZ* فقط در نمونه‌های سوختگی دیده شد، می‌توان فرض کرد این تیپ خاص ممکن است در شرایط حاد بالینی ظاهر شود. در نهایت، انجام این مطالعه در جامعه آماری بزرگ‌تر و بهره‌گیری از روش‌های جامع‌تر تایپینگ را پیشنهاد می‌کنیم.

کلید واژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، پیلی تیپ IV، سیستمیک فیبروزیس

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۴

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۲

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM1398;13(3): 164-174

نویسنده مسئول:

حسین دبیری

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

پست الکترونیک:

hodabiri@gmail.com

مقدمه

نقش دارند. پیلی تیپ چهار سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک عامل اتصالی قدرتمند در انواع محیط‌ها در فرایند اتصال باکتری شرکت می‌کند. پیلی در اتصال به موسین دخالت دارد و به عنوان گیرنده‌ای قوی برای لیگاندهای GM1 و GM2 انسانی در سطح سلول‌های اپی‌تلیالی محسوب می‌شود (۳). به طور کلی، پیلی نوع چهارم به سه زیرخانواده اصلی به نام‌های IVa، IVb و Tad تقسیم می‌شود (۴). سودوموناس آئروژینوزا تنها گونه‌ای از باکتری‌های گرم منفی است که هر سه زیرخانواده از پیلی نوع چهارم در آن مشاهده شده است (۵). در حالت کلی پیلی نوع چهارم به سه زیر خانواده اصلی به نام‌های Tad، T4b و T4a تقسیم می‌شود اما *T4aP* شایع‌ترین نوع آن در

جنس سودوموناس در خانواده سودوموناداسه، شامل باسیل‌های گرم منفی، متحرک، غیر اسید فاست، بدون اسپور، هوازوی مطلق، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت است (۱). سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب مهم در بیماران مبتلا به سوختگی، فیبروزیس سیستمیک تنفسی است و در سیستم‌های فاضلاب بیمارستانی قادر به کلونیزه شدن بوده و از آنجا می‌تواند وارد محیط شود (۲). بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا به علت تولید چندین فاکتور ویروانس همراه سلول و فاکتورهای خارج سلولی است. فاکتور ویروانس همراه سلول شامل پیلی، فلاژل، پیوسیانین، فیمبریه و لیپوپلی ساکارید هستند که فلاژل، پیلی و فیمبریه در اتصال و چسبندگی باکتری به سلول میزبان

سویه‌های گروه V پیلین‌ها و پروتئین‌های کمکی (*TfpZ*) را شبیه به گروه III بیان می‌کنند. ترتیب شیوع ال‌ها به شرح زیر است: گروه ۱، ۳ و ۵ است اگرچه راملینگ و همکارانش در یک مطالعه نشان دادند شایع‌ترین سودوموناس آئروژینوزا به گروه II متعلق است. تا به امروز گروه IV شامل دو ایزوله (*Pa5196*، *Pa97*) می‌شود که پروتئین‌های کمکی *TfpW* و *TfpX* را در پایین دست *PilA4* کد می‌کنند (۹). از آنجاکه میزان مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری سودوموناس آئروژینوزا در سال‌های اخیر به طور چشمگیری افزایش یافته (۱۲-۱۰) و بر اساس توصیفات فوق و تحقیقات انجام گرفته و با وجود تفاوت‌ها و تنوع موجود در سکانس ژن‌های کدکننده پیلی و همچنین تنوع در حضور پیلی‌های نام‌برده و احتمال وجود ارتباط این عوامل با نوع و میزان بیماری‌زایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مقالات موجود، بر آن شدیم به بررسی فراوانی پیلی تیپ چهارم در سودوموناس آئروژینوزا با روش‌های مولکولی موجود پردازیم.

مواد و روش‌ها

از مجموع ۹۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزای جداشده، ۳۵ نمونه محیطی از فاضلاب بیمارستان سوختگی، ۳۰ نمونه جداشده از بیماران سوختگی مراجعه‌کننده به بیمارستان شهیدمطهری و ۲۵ نمونه مربوط به کودکان مبتلا به سیستیک فیبروزیس بیمارستان کودکان مفید بودند. نمونه‌ها از انتهای سال ۹۴ تا انتهای سال ۹۵ جمع‌آوری شدند. براساس درخواست، نمونه‌برداری در شرایط استریل انجام شد و در شرایط مناسب بلافاصله به آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، دانشکده پزشکی منتقل شد.

نمونه‌های خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مراجعه‌کننده به بیمارستان مفید، به محیط کشت مک کانکی آگار و آگار خون‌دار تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و در نهایت نمونه‌ها با روش‌های کشت میکروبی و بیوشیمیایی نظیر اکسیداز و کاتالاز و TSI و OF و رشد در دماهای ۴ و ۴۱ درجه سلسیوس و همچنین خصوصاتی مانند رنگ دانه‌زایی و بو به عنوان سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدند. سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا *PAOI* به عنوان کنترل استفاده شد. نمونه‌های محیطی نیز از فاضلاب بیمارستان سوختگی با رعایت اصول استاندارد جمع‌آوری نمونه‌های باکتریایی محیطی طی ۶ ماه جمع‌آوری شد و سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش فنوتیپی، بیوشیمیایی و آزمایشگاهی شناسایی و ایزوله شدند. نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، سوختگی و ایزوله‌های محیطی، در محیط‌های TSB حاوی ۳۰٪ گلیسرول و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

باکتری‌هایی است که در آزمایشگاه‌ها رشد می‌کنند. دو سیستم مشخص O-گلیکوزیلاسیون پیلی در سودوموناس آئروژینوزا تا به حال آشکار شده است. اول گلیکوزیلاسیون به واسطه *TfpO* (*PilO*) اتفاق می‌افتد. *PilO*، یک O-الیگوساکاریل ترنسفراز است که یک واحد آنتی‌ژن O سنتز شده به وسیله مسیر تولید Lps (لیپوپلی ساکراید) به آمینواسید سرین C-ترمینال پیلین‌های گروه I اضافه می‌کند (*IPilA*) (۶). باکتری‌هایی با *TfpO*‌های جهش‌یافته قادرند پیلی سطحی را ایجاد کنند و حرکت پیچشی از خود نشان می‌دهند. این مسئله بیانگر آن است که گلیکوزیلاسیون برای عملکرد باکتری لازم نیست؛ در عوض، این تغییر پس از ترجمه یک مزیت پاتوژنیک محسوب می‌شود چون باکتری‌هایی که در ژن *TfpO* جهش دارند نسبت به باکتری‌های جهش‌نیافته دارای توانایی کمتری در ایجاد پنمونی موشی حاد هستند (۷). دومین سیستم گلیکوزیلاسیون پیلی در سودوموناس آئروژینوزا در سویه‌های گروه IV، *Pa5196* و *Pa7* که فاقد *TfpO* هستند یافت شد. یک سویه جهش‌یافته آنتی‌ژن O (*Pa5196*)، پیلی‌های گلیکوزیله را ایجاد کرد که نشان‌دهنده آن است که پیلی‌های دارای گلیکان از مسیر دیگری منشأ گرفته‌اند.

تاکنون پنج گروه متفاوت از پیلی‌های اصلی T4a در سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده‌اند که بر اساس طول سکانس، اندازه ناحیه D و شباهت پروتئین‌های کمکی پیلی که در پایین دست ژن پیلی قرار دارند طبقه‌بندی می‌شوند. اولین گروه‌های شناخته شده، گروه I و II بودند، سویه‌های *PA01*، *PAK* و *PA103* پیلین‌های گروه II را بیان می‌کنند. این سویه‌ها فاقد ژن‌های کمکی بین *PilA2* و پایین دست ژن tRNA ترئونین هستند. برعکس سویه ۱۲۴۴ (سویه اپیدمیک لیورپول LES) و سویه *PA2192* یک گروه پیلین I کمی بزرگ‌تر و یک ORF اضافی بین ژن‌های *PilA* و ژن‌های tRNA ترئونین دارند که در گلیکوزیلاسیون پیلین‌های گروه I در جایگاه سرین ۱۰۸ دخیل است. در سال ۱۹۹۵ پروتوتایپ ال‌های گروه III در ایزوله خاصی از سودوموناس آئروژینوزا یافت شد. اسپانچ برگ و همکارانش نشان دادند که پیلی تیپ III، ۱۷۳ اسیدآمینو دارد که بلندتر از پیلی‌های شناخته شده قبلی است و یک قالب خوانش باز با عملکرد نامشخص دارد که امروزه *TfpY* نامیده می‌شود و در پایین دست ژن *PilA* قرار دارد. ایزوله‌های بیشتر با ال‌های گروه III، همچنین ایزوله‌های با ال‌های دو پیلین‌های جدید (گروه‌های III و IV) متعاقباً بیشتر از ۳۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا یافت شد. از آنجاکه اندازه نمونه‌ها کم بوده است، آزمایش تعداد ایزوله‌های بیشتر احتمالاً می‌تواند منجر به کشف گوناگونی بیشتر شود (۸).

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش PCR در حجم ۲۵ μL و بدین شرح انجام گرفت: بافر Amplicon, Iran Master Mix 1x (۱۲/۵ μL)، از هر پرایمر با غلظت ۱۰ mM به میزان ۰/۵ μL و DNA با غلظت ۳۰۰ ngr/L، ۴ μL و آب مقطر دیونیزه استفاده شد. پس از تهیه و آماده‌سازی، میکروتیوب‌ها در دستگاه توموسایکلر (Bio Intellectica, Canada) قرار داده شد. برنامه تکثیر ژن مورد نظر برای هر کدام از سویه‌ها در جدول ۲ خلاصه شده است. محصولات PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی (Bioneer Co., PCR (Korea) و تعیین توالی هر دو رشته Forward و هم Reverse توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. BLAST سکانس‌ها با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد. تحلیل‌های آماری نیز با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد.

برای تهیه نمونه DNA از باکتری به روش جوشاندن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل را در داخل میکروتیوب ریخته و از کلنی‌های تازه کشت (۲۴ ساعته)، ۳-۴ کلنی برداشته، در آب حل کرده و سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در بنماری ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، محلول رویی حاوی DNA برای انجام PCR به میکروتیوب جدید منتقل شد.

در مطالعه ما بررسی وجود ژن‌های کدکننده سه زیرگروه پبلی نوع چهارم شامل ژن‌های *TfpO* و *TfpZ* با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول شماره ۱ انجام شد.

جدول ۱. سکانس نوکلئوتیدی پرایمرهای ژن‌های *TfpO* و *TfpZ* از زیرگونه‌های پبلی تیپ IV

مرجع	طول محصول (bp)	توالی الیگونوکلئوتید (۵'-۳')	نام پرایمر
این مطالعه	۳۶۳	Forward 5'- CGTAGGGCTTGCACTGCTAT-3' Reverse 5'- AAGAACCCTCCCAACACGAC-3'	<i>TfpO</i>
این مطالعه	۴۶۴	Forward 5'- AGATTAGGGCGTTCGCTGTT-3' Reverse 5'- CCGCAGGACATCCATTAGCA-3'	<i>TfpZ</i>

جدول ۲. برنامه اجرایی تکثیر و شناسایی ژن‌های *TfpO* و *TfpZ*

مرحله	<i>TfpO</i>		<i>TfpZ</i>	
	زمان	دما (°C)	زمان	دما (°C)
دنا تورا سیون اولیه	۱۵ دقیقه	۹۵	۱۵ دقیقه	۹۵
دنا تورا سیون	۳۰ ثانیه	۹۵	۳۰ ثانیه	۹۵
اتصال	۳۰ ثانیه	۷۲	۱ دقیقه	۷۲
طویل‌سازی	۳۰ ثانیه	۵۸	۴۵ ثانیه	۶۰
طویل‌سازی نهایی	۷ دقیقه	۷۲	۷ دقیقه	۷۲
چرخه	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵

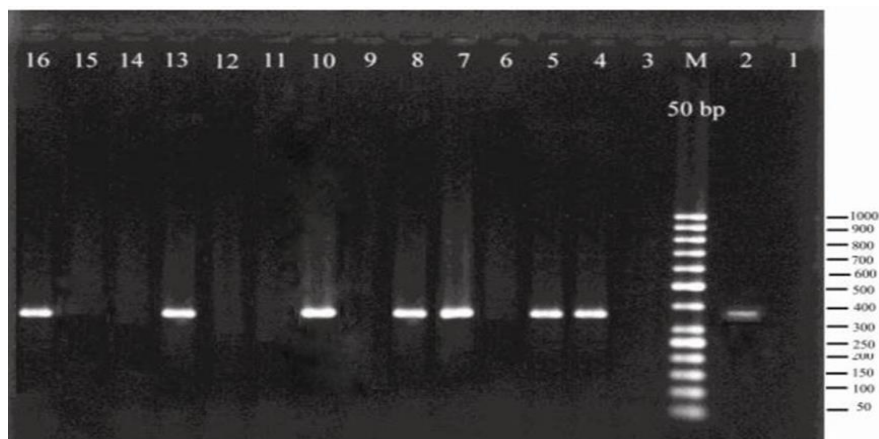
بر اساس تفکیک گروه‌های مورد مطالعه میان فراوانی *TfpO* در هر گروه به شرح زیر است. در بین ۳۵ سویه محیطی، ۳۱ سویه (۸۸/۱۵۷) واجد ژن *TfpO* بودند و ۴ نمونه (۱۱/۴۲٪) از لحاظ این ژن، منفی شناسایی شدند. در بین ۲۵ سویه ایزوله شده از بیماران سیستمیک فیبروزیس، تعداد ۱۷ سویه (۶۸٪) واجد ژن *TfpO* بودند و ۸ نمونه (۳۲٪) از لحاظ این ژن، منفی شناسایی شدند. همچنین در بین سودوموناس آئروژینوزا/های به دست آمده از زخم بیماران سوختگی، ۲۴ سویه (۸۰٪) دارای ژن *TfpO* بودند؛ این در حالی است که ۶ سویه (۲۰٪) از مجموع ۳۰ ایزوله به دست آمده از بیماران سوختگی دارای این ژن نبودند که از لحاظ آماری ارتباط معنی داری نشان ندادند ($P > 0/05$).

یافته‌ها

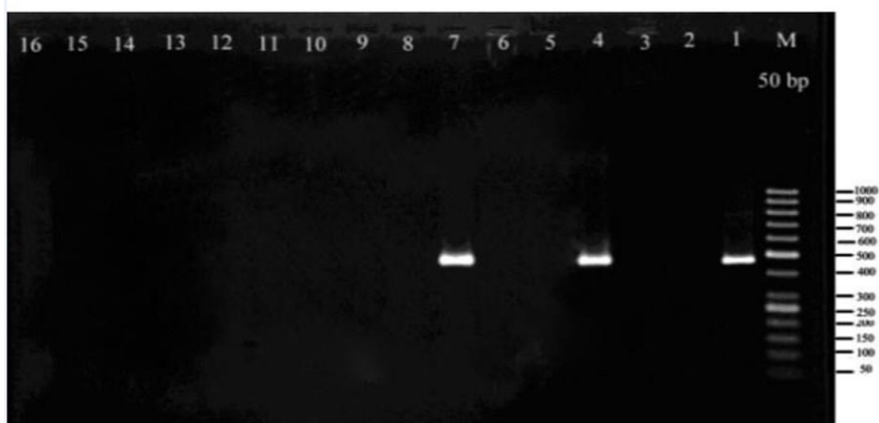
از مجموع ۹۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزای جدا شده، ۳۵ نمونه محیطی، ۳۰ نمونه جدا شده از بیماران سوختگی و ۲۵ نمونه مربوط به سیستمیک فیبروزیس بودند. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان فراوانی ژن *TfpO* در بین ۹۰ ایزوله به دست آمده ۸۰٪ بوده است. ۷۲ ایزوله واجد ژن *TfpO* و ۱۸ نمونه (۲۰٪) از مجموع ۹۰ نمونه، فاقد ژن *TfpO* بودند. پس از اتمام واکنش PCR برای بررسی و نمایش باندها الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز حاوی safe staining انجام شد و نتایج با دستگاه Gel Documentation ثبت شد (شکل‌های ۱ و ۲).

سویه ایزوله شده از بیماران سیستمیک فیبروزیس، تمام سویه‌ها از لحاظ این ژن منفی شناسایی شدند. در بین سودوموناس آئروژینوزا‌های به دست آمده از زخم بیماران سوختگی، فقط ۲ سویه (۶٪/۶۶) دارای ژن *TfpZ* بودند. این در حالی است که ۲۸ سویه (۹۳٪/۳۳) از مجموع ۳۰ ایزوله به دست آمده از بیماران سوختگی دارای این ژن نبودند و ارتباط آماری معنی داری مشاهده نشد ($P > 0/05$).

میزان فراوانی ژن *TfpZ* در ۹۰ ایزوله به دست آمده ۲/۲۲٪ بوده است و دو ایزوله واجد ژن *TfpZ* بوده و ۸۸ نمونه ۹۷/۷۷٪ از مجموع ۹۰ نمونه فاقد ژن *TfpZ* بودند. میزان فراوانی ژن *TfpZ* بر اساس نوع گروه‌های مورد مطالعه که شامل گروه‌های محیطی، سیستمیک فیبروزیس و سوختگی بودند به صورت زیر به دست آمد. در بین ۳۵ سویه محیطی، هیچ کدام از سویه‌ها واجد ژن *TfpZ* نبودند. در بین ۲۵



شکل ۱. نتایج ژل الکتروفورز حاصل از PCR ژن *TfpO* از ژن‌های فرعی پیلی تیپ چهار سودوموناس آئروژینوزا (۳۶۳bp). ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی، M: مارکر ۵۰ جفت بازی DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo scientific)، ۳-۱۶ محصول PCR ژن *TfpO* (۳۶۳ جفت باز)



شکل ۲. نتایج ژل الکتروفورز حاصل از PCR ژن فرعی *TfpZ* پیلی تیپ چهار سودوموناس آئروژینوزا (۳۶۴bp). ستون ۱: کنترل مثبت؛ ستون ۲: کنترل منفی. M: مارکر ۵۰ جفت بازی DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo scientific)، ۳-۱۶ محصول PCR ژن *TfpZ* (۳۶۴ جفت باز)

ترانسپوزون‌ها و دیگر عناصر قرار می‌دهد (۱۳). این در حالی است که سودوموناس آئروژینوزا در منابع محیطی به‌ویژه محیط بیمارستانی کلونیزه می‌شود (۱۴). از فاکتورهای مهم کلونیزه شدن، پیلی تیپ چهار سودوموناس است. امروزه این مطلب پذیرفته شده است که

بحث

بروز قابلیت بالای سازگاری و حیات در محیط‌های متنوع، باکتری را مستعد یک مجموعه عظیم از قطعات DNA خارج کروموزومی و عوامل تغییردهنده ژنوم نظیر باکتریوفازها، اینتگرون‌ها،

مطالعه ما بیشترین میزان *TfpO* در نمونه‌های سیستمیک فیروزیس است و همچنین فراوانی *TfpZ* به ترتیب ۰/۴٪، ۰/۳٪ و ۰/۳٪ است که در مقایسه با مطالعه ما بیشترین یافته‌ها نیز در نمونه‌های بیمارستانی مشاهده شد (۱۸). Deligiann و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که فراوانی *TfpO* در نمونه‌های سیستمیک فیروزیس بسیار بیشتر از سایر گروه‌ها است و در ارتباط با کلونیزه شدن باکتری است (۱۹). همچنین در بررسی Pirmay و همکاران (۲۰۰۹) فراوانی *TfpO* از ایزوله‌های سیستمیک فیروزیس ۵۵/۸٪ بود که تا حدودی بالاتر از میانگین (۴۸/۱۲) است اما ارتباط قوی میان *TfpO* و سیستمیک فیروزیس برخلاف مطالعه انجام شده مشاهده نگردید (۲۰).

در مطالعه حاضر، آنالیز نتایج نشان داد که گروه V پیلی تیپ چهار (*TfpZ*) فقط در ۶۶٪ از نمونه‌های سوختگی دیده شد و سایر نمونه‌ها فاقد این گروه از پیلی تیپ چهار بودند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه ما نشان داد شیوع گروه I پیلی تیپ چهار (*TfpO*) در جمعیت سویه‌های مورد مطالعه سودوموناس *آئروژینوزا* بالا بود و از آنجاکه این ژن فرعی در انواع فرآیندهای باکتریایی به‌ویژه تغییرات پس از ترجمه (گلیکوزیلاسیون پیلی) و شکل‌گیری بیوفیلم نقش دارد، شیوع نسبتاً بالای آنها نشان‌دهنده میزان بالای ویرولانسی سویه‌های مورد مطالعه ایرانی است. براساس مطالعات انجام گرفته و نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌شود: حجم جامعه مورد مطالعه افزایش یابد؛ طیف جامعه متنوع‌تر شود؛ نمونه‌ها بر اساس روش‌های معمول تایپینگ تیپ‌بندی شوند؛ خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی بیشتری در ارتباط با زیرگونه‌های پیلی تیپ چهارم بررسی شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری صمیمانه گروه میکروپزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر می‌کنیم.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

سودوموناس *آئروژینوزا* قادر به بیان سه نوع مشخص و مجزا از زیرگونه‌های پیلی نوع چهارم به نام‌های IVa، IVb و Tad است.

پیلی تیپ IVa شایع‌ترین نوع آن در باکتری‌هایی است که در آزمایشگاه‌ها رشد می‌کنند. ژن‌های فرعی پیلی تیپ چهار در سودوموناس *آئروژینوزا* تاکنون شناسایی شده‌اند که بر اساس طول سکانس، اندازه ناحیه D و شباهت پروتئین‌های کمکی پیلی به ۵ گروه طبقه‌بندی می‌شود و در گلیکوزیلاسیون پیلی تیپ چهار نقش دارند. تاکنون مطالعه‌ای پیرامون مقایسه میزان فراوانی ژن‌های فرعی پیلی نوع چهارم در بین سویه‌ها و جمعیت‌های سودوموناس *آئروژینوزا* انجام نشده است و تنها بررسی‌های محدودی در زمینه گوناگونی ژنومیکس و میزان فراوانی زیر گونه IVa پیلی نوع چهارم انجام گرفته است (۱۵-۱۷). از این رو، در مطالعه حاضر به بررسی حضور ژن‌های فرعی پیلی تیپ چهارم به روش PCR در بین جامعه سودوموناس *آئروژینوزا*‌های ایزوله شده از بیماران سیستمیک فیروزیس، سوختگی و محیطی پرداختیم که از شبکه فاضلاب مرکز مراقبت‌های سوختگی ایزوله شده بود.

با توجه به نتایج به دست آمده، درصد قابل‌توجهی از سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا*ی جدا شده از منابع مختلف در این مطالعه، دارای گروه I پیلی تیپ چهار (*TfpO*) بودند. پراکندگی و شیوع این گروه از پیلی بسته به نوع نمونه، متفاوت است و نمونه‌های محیطی و سوختگی بیشترین شیوع را در رابطه با این نوع از پیلی تیپ چهار را با شیوع ۸۸٪ در نمونه‌های محیطی و ۸۰٪ در نمونه‌های سوختگی نشان دادند. به دنبال آن، نمونه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سیستمیک فیروزیس، ۶۸٪ دارای این نوع از پیلی تیپ چهار بودند. این یافته نشان می‌دهد سویه‌های محیطی و سوختگی دارای قرابت بیشتری نسبت به سویه‌های جدا شده از سیستمیک فیروزیس هستند. Kus و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که فراوانی گروه I پیلی تیپ چهار (*TfpO*) در سویه‌های جدا شده از سودوموناس *آئروژینوزا* بیشتر از سایر گروه‌ها بوده است و باعث کلونیزاسیون اولیه در بیماران سیستمیک فیروزیس می‌شود (۷) و منشأ سودوموناس *آئروژینوزا* در بیماران سیستمیک فیروزیس، از محیط است. طبق مطالعه Kus و همکاران (۲۰۰۸) فراوانی *TfpO* در نمونه‌های بیمارستانی، محیطی و سیستمیک فیروزیس به ترتیب ۳۰/۵٪، ۵۸/۳٪ و ۶۹/۷٪ است که در مقایسه با

References

1. McCallum M, Tammam S, Little DJ, Robinson H, Koo J, Shah M, et al. PilN Binding Modulates the Structure and Binding Partners of the Pseudomonas aeruginosa Type IVa Pilus Protein PilM. Journal of biological Chemistry. 2016; 291, 11003-11015. [DOI:10.1074/jbc.M116.718353] [PMID] [PMCID]
2. Buensuceso RN, Daniel-Ivad M, Kilmury SL, Leighton TL, Harvey H, Howell PL, et al. Cyclic AMP-Independent Control of Twitching Motility in Pseudomonas aeruginosa. Journal of bacteriology. 2017; 199(16):e00188-17. [DOI:10.1128/JB.00188-17] [PMID] [PMCID]

3. Ortega DR, Fleetwood AD, Krell T, Harwood CS, Jensen GJ, Zhulin IB. Assigning chemoreceptors to chemosensory pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. PNAS. 2017; 114 (48) 12809-12814. [DOI:10.1073/pnas.1708842114] [PMID] [PMCID]
4. Gold VA, Salzer R, Averhoff B, Kühlbrandt W. Structure of a type IV pilus machinery in the open and closed state. Elife. 2015; 4:e07380. [DOI:10.7554/eLife.07380] [PMID] [PMCID]
5. Leighton TL, Mok MC, Junop MS, Howell PL, Burrows LL. Conserved, unstructured regions in *Pseudomonas aeruginosa* PilO are important for type IVa pilus function. Scientific reports. 2018; 8:2600. [DOI:10.1038/s41598-018-20925-w] [PMID] [PMCID]
6. Tan RM, Kuang Z, Hao Y, Lee F, Lee T, Lee RJ, Lau GW. Type IV Pilus Glycosylation Mediates Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Opsonic Activities of the Pulmonary Surfactant Protein A. Infection and Immunity 2015; 83(4): 1339-46. [DOI:10.1128/IAI.02874-14] [PMID] [PMCID]
7. 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(Pt 5):1315-26. [DOI:10.1099/mic.0.26822-0] [PMID]
8. Smedley JG, 3rd, Jewell E, Roguskie J, Horzempa J, Syboldt A, Stolz DB, et al. Influence of pilin glycosylation on *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilus function. Infection and immunity. 2005;73(12):7922-31. [DOI:10.1128/IAI.73.12.7922-7931.2005] [PMID] [PMCID]
9. Asikyan ML, Kus JV, Burrows LL. Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology. 2008;190(21):7022-34. [DOI:10.1128/JB.00938-08] [PMID] [PMCID]
10. Sadari H, Lotfalipour H, Owlia P, Salimi H. Detection of Metallo- β -Lactamase producing *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Tehran, Iran. Lab Medicine. 2010;41(10):609-12. [DOI:10.1309/LM.QJF9J3T2OACD] [PMID] [PMCID]
11. Ranjbar R, Owlia P, Sadari H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. Acta Medica Iranica. 2011;49(10):675-9.
12. Boujari Nasrabadi MR, Hajia M. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in Tehran Reference Burn Hospital, Tehran, Iran. African Journal of Microbiology Research 2012; 6(7):1393-6. [DOI:10.5897/AJMR11.1048]
13. Cohen-Cymbberknoh M, Gilead N, Gartner S, Rovira S, Blau H, Mussaffi H, et al. Eradication failure of newly acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates in cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis. 2016; 15(6): 776-782. [DOI:10.1016/j.jcf.2016.04.006] [PMID]
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 microbiology ecology. 2006; 57(1):158-67. [DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00100.x] [PMID]
15. Basso P, Ragno M, Elsen S, Reboud E, Golovkine G, Bouillot S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis. American society for microbiology. 2017; 8(1): e02250-16. [DOI:10.1128/mBio.02250-16] [PMID] [PMCID]
16. Streeter K, Katouli M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. Infect Epidemiol Med. 2016; 2(1): 25-32. DOI: 10.18869/m odares.iem.2.1.25 [DOI:10.18869/modares.iem.2.1.25]
17. Allison TM, Conrad S, Castric P. The group I pilin glycan affects type IVa pilus hydrophobicity and twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* 1244. Microbiology. 2015; 161(9): 1780-1789. [DOI:10.1099/mic.0.000128] [PMID] [PMCID]
18. Kus J. Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilins and identification of a novel D-arabinofuranose post-translational modification. 2008. (Doctoral dissertation).
19. Deligianni E, Pattison S, Berrar D, Ternan NG, Haylock RW, Moore JE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. BMC Microbiology. 2010; 10(38): 1471-2180. [DOI:10.1186/1471-2180-10-38] [PMID] [PMCID]
20. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. PLoS ONE. 2009; 4(11): e7740. [DOI:10.1371/journal.pone.0007740] [PMID] [PMCID]