

بررسی فراوانی PAPI-1 در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

سیده زهرا رسایی^۱، نورخدا صادقی فرد^{۲*}، محمدرضا ذوالفقاری^۱، سبحان غفوریان^۲، پگاه شکیب^۱، آذر ولی زاده^۱

(۱) گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

(۲) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۷

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا یکی از پاتوژن های فرصت طلب بیمارستانی است که در بیماران سوختگی، تنفسی، افراد مبتلا به بیماری وراثتی فیبروز سیستیک، باکتری، سپتی سمی و خیلی از عفونت های شایع دیگر دخیل می باشد. سودوموناس آئروژینوزا دارای دو نوع PAPI حلقوی شامل PAPI-1 (108kb) و PAPI-2 (11kb) می باشد. جزیره بزرگ یعنی PAPI-1 نقش مهم و کلیدی تری در ویرولاانس، تکامل و گسترش روند بیماری زایی باکتری دارد و بسیاری از آلودگی ها در سلول ناشی از عملکرد این ژن می باشد، از جمله می تواند به عفونت های مزمن در افرادی با سیستم فیروزیس کمک کند. بررسی فراوانی PAPI-1 در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا هدف این مطالعه بود.

مواد و روش ها: ایزوله ها با روش های مرسوم شناسایی شدند و پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش واکنش زنجیره پلی مرایی وجود ژن کدکننده PAPI-1 در سویه های سودوموناس آئروژینوزا تایید شد.

یافته های پژوهش: از ایزوله های مورد بررسی، ۱۷ نمونه (۳۵/۴۱ درصد) دارای ژن PAPI-1 بودند. از ۲۹ نمونه بخش ادراری ایلام، ۹ نمونه (۳۱/۰۳ درصد) دارای ژن PAPI-1 بودند، و از ۱۹ نمونه بخش سوختگی بیمارستان میلاد تهران، ۸ نمونه (۴۲/۱ درصد) دارای ژن PAPI-1 گزارش شدند. این جزیره بزرگ سودوموناس آئروژینوزا، یعنی PAPI-1، تقریباً به نسبت مساوی هر دو بخش عفونت های سوختگی و ادراری را داشتند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج تحقیقات و آزمایشاتی که در ایران صورت پذیرفت حاکی از این بود که جزیره بزرگ سویه PA14 سودوموناس آئروژینوزا یعنی PAPI-1 به دنبال اثبات مطالعات قبلی نقش بسیار گسترده ای در عفونت باکتریایی دارد. این نتایج حضور فعال این جزیره بزرگ را در پیشرفت بیماری زایی و عفونت باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا را نشان می دهد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، فیبروز سیستیک، PAPI

* نویسنده مسئول: گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: sadeghifard@gmail.com

مقدمه:

این در حالی است که PAPI-2 حامل ژن رمزگذاری شده ExoUcytotoxin قوی و به احتمال زیاد باقی مانده از جزایر بزرگ تر خواهد بود از طرفی انتقال ژن ها در جزایر بیماری زایی به صورت انتقال افقی (HGT) مرتبط با کروموزوم می باشد، (۱۴،۱۵،۱۶). هدف اختصاصی این طرح تعیین میزان فراوانی PAPI در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا به دلیل نقش مهم آن در گسترش روند بیماری زایی باکتری است.

مواد و روش ها

جداسازی و تشخیص باکتری: ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان های میلاد تهران، امام خمینی ایلام و آزمایشگاه مرکزی ایلام جمع آوری شد، این نمونه ها از عفونت های سوختگی، ادراری جدا سازی شدند. از ۶۳ نمونه جدا شده از ۳ مرکز آزمایشگاهی، پس از انجام تست های تأییدی بیوشیمیایی از جمله آزمون های اکسیداز، آرژنین دهیدرولاز، بررسی حرکت، اکسیداسیون گلوکز در محیط OF، رشد در دمای ۴۲ درجه و تولید رنگدانه، ۴۸ نمونه سودوموناس آئروژینوزا تأیید گردید. استخراج DNA: سویه های مورد نظر ابتدا در محیط لوریا برات کشت داده شدند و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد ساتنریفوژ و از رسوب حاصل استخراج صورت گرفت، استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت bioneer (ساخت کره) بر اساس دستورالعمل کیت انجام گرفت. آزمون PCR: نمونه های DNA استخراج شده را از یخچال خارج نموده، سپس ۰/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master mix با حجم نهایی ۲۵ پیکومول (هر ویال حاوی ۰/۸ میلی مول Mgcl2 و ۰/۲ میلی مول dNTP و ۵ پیکومول از پرایمر ویک واحد Taq polymerase) اضافه گردید. توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده، عبارت بود از:

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی از خانواده سودوموناسه است. سودوموناس آئروژینوزا یکی از پاتوژن های فرصت طلب و مهم بیمارستانی است که در واقع مقاومت بالایی به اکثر آنتی بیوتیک های رایج دارد و به همین دلیل درمان عفونت های ناشی از آن با مشکلات فراوانی همراه است. از عوامل دخیل در مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک ها می توان به کپسول آلژینات پلی مری آنیونیک اشاره نمود، (۱،۲،۳،۴). این باکتری در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند مثلاً بیماران سوختگی، تنفسی، سرطانی تحت شیمی درمانی، افراد مبتلا به بیماری وراثتی فیبروز سیستیک، باکتریمی، سپتی سمی و خیلی از عفونت های بیمارستانی دیگر به وضوح دیده می شود، (۵،۶،۷،۸). سودوموناس آئروژینوزا دارای دو نوع PAPI (Pseudomonas Aeruginosa) PAPI=Pathogenicity Island حلقوی شامل PAPI-1 (108kb) و PAPI-2 (11kb) می باشد، (۹،۱۰)، که PAPI-1 به عنوان جزایر بیماری زایی بزرگ و PAPI-2 به عنوان جزایر بیماری زایی کوچک شناخته شده اند، 2 و PAPI-1 هر دو جایگاه شان در کنار ژن tRNA لیزین قرار گرفته است، جزیره بزرگ (PAPI-1) نقشی مهم تر و کلیدی در ویرولانسی، تکامل و گسترش روند بیماری زایی باکتری دارد و بسیاری از آلودگی ها در سلول ناشی از عملکرد این ژن می باشد، از جمله می تواند به عفونت های مزمن در افرادی با سیستم فیبروزیس کمک کند. این جزایر بیماری زایی 2 و PAPI-1 می توانند به طور انفرادی یا اشتراکی در بدخیم کردن سویه PA14 سودوموناس آئروژینوزا نقش اساسی داشته باشند، (۱۱،۱۲،۱۳). PAPI-1 حامل ژن چند نظارتی، از جمله PvrR، که کنترل بیوفیلم و مقاومت های آنتی بیوتیکی باکتری را انجام خواهد داد به خصوص در ارتباط با عفونت مزمن افراد مبتلا به فیبروز سیستیک که تأثیر بیشتری دارد

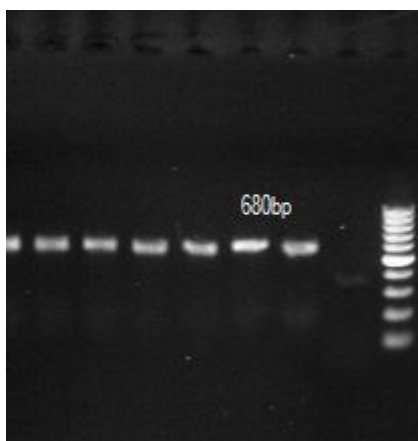
Primers	Sequence of primers	Size of amplicon
PAPI-1	F: 5' – CGAGCACAGAAATGTCCTGA – 3' R : 5' – TAGGAGGTTGTTGCGGTTCT – 3'	680 bp

پس از انجام آزمایشات و بررسی های متعدد، نتایج حاصل از PCR نشان داد که با توجه به موضوع تحقیق بررسی فراوانی PAPI-1 در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از ۴۸ سویه مورد مطالعه، ۱۷ سویه سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن PAPI-1 بوده و ۳۱ سویه نیز از ۴۸ سویه فاقد ژن PAPI-1 گزارش شدند. (شکل شماره ۱) از ۲۹ نمونه بخش ادراری ایلام، ۹ نمونه (۳۱/۰۳ درصد) دارای ژن PAPI-1 بودند، و از ۱۹ نمونه بخش سوختگی بیمارستان میلاد تهران، ۸ نمونه (۴۲/۱ درصد) دارای ژن PAPI-1 گزارش شدند.

در نهایت از محصولات PCR حاصل بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ گردید. هم چنین از مارکر ۱۰۰bp جهت تایید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده استفاده شد.

یافته های پژوهش

از ۴۸ نمونه سودوموناس آئروژینوزا، ۱۹ سویه (۳۹/۵۸ درصد) از بخش سوختگی بیمارستان میلاد تهران و ۲۹ سویه (۶۰/۴۱ درصد) نیز از مراکز ایلام، جمع آوری شدند و از ۲۹ سویه مربوط به ایلام، ۱۶ نمونه از بخش ادرار بیمارستان امام خمینی و ۱۳ نمونه از بخش ادرار آزمایشگاه مرکزی بوده است.



شکل شماره ۱. تصویر ژل محصول PCR ژن PAPI-1 -
ردیف M: سایزمارکر 100 bp می باشد.

-ردیف ۱: سویه سودوموناس آئروژینوزا فاقد ژن PAPI-1

-ردیف ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۸: سویه سودوموناس آئروژینوزا دارای PAPI-1

دانشگاه Leicester آمریکا، آزمایشات متعددی را به صورت جداگانه روی جزایر بیماری زایی PAPI-1,2 سویه PA14 سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند و سویه PA14 را با سویه PAO1 سودوموناس آئروژینوزا مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که در واقع سویه PA14 باکتری نقش بیشتر و کلیدی تری در بدخیم کردن عفونت باکتریایی دارد در مقایسه با سویه PAO1 و این امر به دلیل حضور دو جزیره بیماری زایی PAPI-1,2 در سویه PA14 باکتری می باشد که در سویه PAO1 هنوز این جزایر بیماری زا شناخته و شناسایی نشده اند. (۲۰)

بحث و نتیجه گیری

در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا بررسی جزایر بیماری زا PAPI-1,2 و نقش کلیدی و مهم این جزایر در گسترش روند بیماری زایی و عفونت باکتریایی زیاد مورد بررسی قرار نگرفته است این در حالی است که این جزایر بسیار پراهمیت بوده و نیاز به بررسی های بیشتری دارند به طوری که در این زمینه در کشور ما هیچ گونه پژوهش و تحقیق جامعی صورت نگرفته است اما در سایر کشورها بررسی های اندکی انجام گرفته، (۱۷،۱۸،۱۹)، که نشان دهنده اهمیت موضوع می باشد، برای مثال در سال ۲۰۱۰ و ۲۰۰۹ میلادی، Ewan M. Harison, Melissa E.K. carter

را در میزبان های مختلف ایجاد نماید از جمله آلودگی به واسطه جزیره بزرگ سودوموناس آئروژینوزا در انسان باعث ایجاد عفونت مزمن ریوی سیستمیک فایبروزیس خواهد شد که بسیار خطرناک بوده و باید کنترل شود. (۲۳)

استپ نلوری و همکاران سال ۲۰۰۶ در دانشگاه واشنگتن به بررسی هر دو جزیره بیماری زایی PAPI-1,2 پرداختند و نتایج آزمایشات بدین صورت بود که در واقع PAPI-1 یعنی جزیره بزرگ بیماری زایی سویه PA14 سودوموناس آئروژینوزا دارای وزن مولکولی 108kb می باشد که هر کدام از ژن های این جزیره بسیاری از ویژگی های بیماری زایی برای باکتری را به رمز درآورده و تحت کنترل دارند جایگاه این جزیره بزرگ به صورت یکپارچه نزدیک ژن tRNA لیزین است از طرفی جزیره کوچک بیماری زایی باکتری یعنی PAPI-2 دارای وزن مولکولی 11kb است که جایگاه این جزیره نیز نزدیک ژن tRNA لیزین می باشد و این جزیره حاوی ژن هایی است که این ژن ها نیز در بیماری زایی باکتری نقش دارند. اما نکته حائز اهمیت این است که ژن های جزیره بزرگ در مقایسه با ژن های جزیره کوچک نقش بیش و کلیدی تری در بدخیم کردن عفونت و گسترش روند بیماری زایی باکتری خواهد داشت، جزیره بزرگ حامل ژن چند نظارتی از جمله pvrR می باشد که ژن مهمی است و جزیره کوچک نیز حامل ژن ytotoxin , Exou قوی و به احتمال زیاد باقی مانده از جزیره بزرگ تر می باشد. (۲۴،۲۵). نتایج این مطالعه نیز با مطالعات ذکر شده مطابقت دارد و نتایج بررسی این است که در ۴۸ سویه مورد مطالعه ۱۷ سویه مثبت گزارش شدند که این ۱۷ سویه از بخش عفونت های سوختگی و ادراری جمع آوری شده بودند یعنی ۳۵/۴۱ درصد از نمونه های بالینی بررسی شده دارای ژن PAPI-1 گزارش شدند.

References

1-Harris AD, Smith D, Johnson JA, Bra-dham DD, Roghmann MC. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aerugin-osa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2007;34:340-5.
2-Defez C, P Daurès J. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aerugin-osa*

Michelle qiu carter, Jian Shunchen سال ۲۰۱۰ در دانشگاه هاوارد، بوستون، به بررسی جزیره بزرگ بیماری زایی PAPI-1 سودوموناس آئروژینوزا پرداختند و روند انتقال را که از طریق Pilus نوع چهارم جزیره صورت می گرفت را در ۴۲ نمونه مورد آزمایش قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که سودوموناس آئروژینوزا توسط مکانزیم Conjugative از طریق pilus نوع چهارم واقع در جزیره PAPI-1 روند انتقال را انجام می دهد و پس از تکامل و گسترش جزیره و همین طور حضور ژن های مختلف با عملکردهای متعدد، انتقال افقی ژن یا به عبارتی فرایند HGT وارد عمل شده و نیمی از نمونه ها یعنی حدود ۲۱ نمونه حضور جزیره بزرگ بیماری زایی یعنی PAPI-1 را تأیید نمودند. (۲۱،۲۲)

سال ۲۰۰۳ در دانشکده پزشکی هاوارد، Jianxin He , Reginald. Baldini و همکاران به بررسی ساختار و عملکرد جزیره PAPI-1 پرداختند و مشاهدات آن ها حاکی از آن بود که جزیره PAPI-1 دارای ساختار موزاییک می باشد که نوترکیبی های مختلفی در این ساختمان موزاییکی PAPI-1 صورت می گیرد از طرفی از لحاظ عملکردی در واقع حضور Pili نوع چهارم گروه B در جزیره بزرگ یکی از مهم ترین عواملی است که به شدت نقش مهمی در ترویج پاتوژنتر باکتری به سلول های میزبان خواهد داشت و همین طور باعث چسبیدن باکتری به سطوح مختلف و سلول های گوناگون از جمله سطح سلول های اپی تلیال می شود نکته دیگر این که ژن های موجود در جزیره بزرگ بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا در رشد و تکامل باکتری نقش به سزایی دارند و به مراتب باکتری نیز به واسطه حضور جزیره قادر است در میزبان های متنوع از جمله گیاهان و پستانداران و همین طور در محیط های متفاوت رشد و زندگی کند و بیماری هایی

sa nosocomial infection. *J Hospital Infect* 2004;57:209-16.

3-Akahane K, Sakai D, Furuya N, Komano T. Analysis of the pilU gene for the prepilin peptidase involved in the biogenesis of type IV pili encoded by plasmid R64. *Mol Genet Genomics* 2005;273:350-9.

- 4-Chambers D, Scott F, Bangur R, Davies R. Factors associated with infection by *Pseudomonas aeruginosa* in adult cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2005;26:651-6.
- 5-Ryall B, Davies JC, Wilson R, Shoemark A, Williams HD, *Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *Eur Respir J* 2008; 32:740-7.
- 6-Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity—a Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2001;2:376-81.
- 7-Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005;54:37-43.
- 8-Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:414-24.
- 9-Senthil Selvan S, Franz v G, Prabhakar S. Evidence for Polyadenylated mRNA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2004; 20:7015-8.
- 10-He J, Baldini RL, Deziel E, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J, et al. The broad hosrange pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 2530-5.
- 11-Wareham DW, Papakonstantin A, Curtis MA. The *Pseudomonas aeruginosa* PA14 type III secretion system is expressed but not essential to virulence in the *Caenorhabditis elegans*-*P. aeruginosa* pathogenicity model. *Microbiol Lett* 2005;24:209-16.
- 12-Kim SR, Komano T. The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. *J Bacteriol* 1997;179:3594-603.
- 13-Carter MQ, Chen J, Lory S. The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island papi-1 is transferred via a novel type IV pilus. *J Bacteriol* 2010;13:3249-58.
- 14-Winstanley C, Langille MG, Fothergill JL, Kukavica-Ibrulj I. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 2009;19:12-23.
- 15-Harrison EM, Carter ME, Luck S, Ou HY. Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14. *Infect Immun* 2010;4:1437-46.
- 16-Song Lei, Zhang X. Innovation for ascertaining genomic islands in PAO1 and PA14 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chinese Sci Bull* 2009;54:3991-9.
- 17-Ratner AJ, Bryan R, Weber A, Nguyen S, Barnes D, Pitt A, et al. Cystic fibrosis pathogens activate Ca²⁺-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:19267-75.
- 18-Fonseca AP, Sousa JC. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. *Int J Antimicrob Agents* 2007;4:236-41.
- 19-Kielhofner M, Atmar RL, Hamill RJ, Musher DM. Life-threatening *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1992;14:403-11.
- 20-Liang X, Pham XQ, Olson MV, Lory S. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *P. aeruginosa*. *J Bacteriol* 2001;183:843-53.
- 21-Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:289-314.
- 22-Kahane K, Sakai D, Furuya N, Komano T. Determining the involved gene in bacterial pathogenesis. *Mol Genet Genomics* 2005;273:350-9.
- 23-Daniel GL, Jonathan MU, Gang WU. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 2006;7:R90.
- 24-Stover CK, Pham XQ, Erwin AL. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959-64.
- 25-Jianhui X, Michael FH, Huifen Y, Huiling C. IMP gene and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the people's republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:355-8.

Study of PAPI-1 Frequency in Clinical Strains of *Pseudomonas Aeruginosa*

Rasaei S¹, Sadeghifard N^{2*}, Zolfaghari MR¹, Ghafourian S², Shakib P¹, Valizadeh A¹

(Received: 18 April 2012

Accepted: 8 Octo. 2013)

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) is one of the opportunistic pathogens in hospital that afflicts patients with burning damages, respiratory diseases, cystic fibrosis, bacterinemia, septicemia and many of other prevalent infections. *P.aeruginosa* has two types of cyclic PAPI such as PAPI-1(108 kb) and PAPI-2 (11kb). The big island, namely, PAPI-1 has an important role in virulence, evolution and development of pathogenic process of the bacteria. Many cellular contamination capabilities of the bacterium including chronic infections in people with cystic fibrosis are arisen from function of the gene. The aim of this study was to evaluate the frequency of PAPI-1 gene in clinical isolates of *P.aeruginosa*.

Materials & Methods: Clinical isolates of *P.aeruginosa* were identified by traditional methods. After extraction of genomic DNA, the existence of PAPI-1 coding gene was confirmed by using polymerase chain reaction (PCR).

Findings: Of the isolates under study, 17 samples (35.41%) contained PAPI-1 gene. Among 29 samples of urinary tract origin, 9 samples (31.03%) contained PAPI-1 gene and from 19 samples of burn injuries, 8 samples (42.1%) contained PAPI-1. This big island of *P.aeruginosa*, namely, PAPI-1, was equally existed in burning and urinary infection samples.

Discussion & Conclusion: Results of the present study indicated that the big island, PAPI-1, in PA14 strain of *P.aeruginosa* has a very wide role in bacterial infections. These results revealed the active presence of this big island in the development of pathogenicity and bacterial infection capability by *P.aeruginosa*.

Keywords: *pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, PAPI

1. Dept of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

2. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

* (corresponding author)