مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۱۰، مهر ۱۳۹۵، صفحه ۵۹-۵۳

فراوانی تولید فاکتورهای بیماری‌زایی در جدایه‌های کلینیکی *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*

رابعه ایزدی آملی (MSc)[۱]، جمیله نوروزی (PhD)[۲*]، آذر سبکبار (PhD)[۱]، رمضان رجب‌نیا(PhD) [۳]

۱-گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲-گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۳-مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۹۵/۱/۲۶، اصلاح: ۹۵/۳/۱۲، پذیرش: ۹۵/۷/۵

خلاصه

سابقه و هدف: *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، به عنوان باکتری نوظهور جهانی شناخته شده است که با محدوده وسیعی از بیماری‌ها در ارتباط است. هدف از این مطالعه، بررسی عوامل بیماری‌زای باکتری شامل آنزیم‌های خارج سلولی این باکتری، توانایی تشکیل بیوفیلم و ژن *rpfF* دخالت کننده در کروم سنسینگ می باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی بر روی نمونه‌ها ادرار، خون و خلط، نمونه‌های سواب از سیستم مانومتر اکسیژن و شیر آب بیمارستان‌ها، همچنین ساکشن دندانپزشکی انجام شد. ابتدا، شناسایی باکتری با روش کشت و تست‌های بیوشیمیایی انجام و برای تایید قطعی باکتری، بررسی وجود ژن *23S rRNA* به روش real-time PCR انجام شد. جدایه‌ها از نظر آنزیم‌های ژلاتیناز، همولیزین، هیالورونیداز، لسیتیناز، لیپاز و پروتئاز به روش فنوتیپی و تشکیل بیوفیلم به روش میکروپلیت بررسی شدند. همچنین وجود ژن *rpfF* جدایه‌ها به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۱۰۰٪ جدایه‌ها، دارای ژن *rpfF* بودند. بیشتر جدایه‌ها دارای آنزیم‌های ژلاتیناز (۹۰٪)، همولیزین (۸۵٪)، پروتئاز (۷۵٪)، لسیتیناز (۹۰٪)، لیپاز (۷۵٪) و هیالورونیداز (۱۰۰٪) بودند. تشکیل بیوفیلم در ۱۵٪ جدایه‌ها، دیده نشد، ۴۵٪ جدایه‌ها، قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف، ۴۰٪ جدایه‌ها، قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط و هیچ‌کدام از جدایه‌ها، قدرت تشکیل بیوفیلم قوی نداشتند. همبستگی بین متغیرهای همولیزین و لیپاز، همولیزین و لسیتیناز و لسیتیناز و لیپاز، معنی‌دار بودند.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه جدایه‌های باکتری، واجد عوامل بیماری‌زای متعددی شامل ژن *rpfF* بودند، همچنین، توانایی تولید آنزیم‌های خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم را به میزان بالا داشتند.

واژه‌های کلیدی: *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، ژن *rpfF*، آنزیم، بیوفیلم.

مقدمه

جنس استنوتروفوموناس متعلق به زیرکلاس $\beta - \gamma$ از پروتئوباکتری‌ها است (۱). در اوایل دهه ۱۹۴۰، تحت عنوان Bacterium booker معرفی شد (۲). در سال ۱۹۸۱ به عنوان *سودوموناس مالتوفیلیا* نامیده گردید و کمی بعد به عنوان *گزانتوموناس مالتوفیلیا* طبقه‌بندی (۳) و در نهایت، به عنوان *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* معرفی شد (۴). *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، باکتری باسیلی شکل غیرتخمیری، گرم منفی و هوازی بوده و به عنوان باکتری نوظهور جهانی شناخته شده است. عفونت ناشی از این باکتری، به طور مشخص به بیماران بستری شده در بیمارستان که دارای اختلال سیستم ایمنی هستند، محدود می‌شود. عفونت ایجاد شده توسط این باکتری در بیماران سرطانی به طور قابل توجهی نسبت به دو دهه گذشته افزایش نشان داده، به ویژه در بیمارانی که دچار سرطان حاد ریه می‌باشند(۷-۵). عفونت ناشی از این باکتری در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس (Cystic fibrosis) و افرادی که دچار سوختگی شده‌اند و نیز در افرادی که سیستم دفاعی بدن آنها آسیب دیده و حساس به عفونت‌های فرصت‌طلب هستند، مشاهده شده است (۸). این باکتری به همراه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های تنفسی بدست آمده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مشاهده شده است (۹). *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، بیشتر در عفونت‌های دستگاه تنفسی (۱۰)، باکتریمی (۱۱)، عفونت صفراوی (۱۲)، عفونت‌های استخوان و پیوندها، دستگاه ادراری و بافت‌های نرم (۱۳)، اندوفتالمیت (۱۴)، عفونت‌های چشم (۱۵)، اندوکاردیت (۱۶)، عفونت خون (۱۷)، باکتریمی در ارتباط با کاتتر و مننژیت (۱۷) مشاهده شده است. عفونت توسط این باکتری در موارد بدخیمی، شوک سپتیک حاد و پیوند اعضایی که منجر به شکست می‌گردد، می‌تواند، خطر مرگ را بدنبال داشته باشد. از عواملی که در بیماری‌زایی این باکتری نقش دارد، ترشح آنزیم‌های خارج سلولی از جمله پروتئیناز، لسیتیناز، ژلاتیناز، لیپاز، هیالورونیداز، همولیزین و DNase، همچنین تولید رنگدانه ملانین، حرکت باکتری و توانایی تشکیل بیوفیلم می‌باشد (۱۸). آنزیم ها، نقش مهمی در بیماری‌زایی باکتری به عهده دارند، زیرا قادر به ایجاد آسیب در بافت میزبان می‌باشند که برای ایجاد عفونت مهم است (۱۸). یکی از ژن‌هایی که در بیماری‌زایی باکتری، حائز اهمیت است، ژن *rpfF* می‌باشد، این ژن، بخشی از

این مقاله حاصل پایان نامه دکتری تخصصی رابعه ایزدی آملی دانشجوی رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر جمیله نوروزی
آدرس: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۲۲۹۵۰۹۵۵- ۰۲۱
E-mail: NowrooziJ@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.53]

مجموعه چند ژنی است که تنظیم کننده عوامل بیماری‌زا بوده و در ایجاد کروم سنسینگ نقش دارد (۱۹). با توجه به عوارض گاهی مرگبار این باکتری برای انسان ها، پژوهش و مطالعات بیشتر در این خصوص نیز ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به افزایش موارد گزارش شده عفونت توسط این باکتری هدف از این تحقیق، مطالعه بیشتر این باکتری، بررسی عوامل بیماری زا و یافتن آگاهی در مورد آن می باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی به مدت ۶ ماه از دی ماه ۱۳۹۳ تا خرداد ماه ۱۳۹۴ بر روی ۲۹۴۷ نمونه ادرار، ۷۷۷ نمونه خون و ۱۰۰ نمونه خلط بیماران مراجعه کننده و بستری بیمارستان امام علی (ع) آمل، ۱۱۰ نمونه سواب از سیستم مانومتر اکسیژن و ۲۴۰ نمونه از شیر آب بیمارستان‌های هفده شهریور، امام علی (ع) و امام رضا (ع) آمل و همچنین ۱۲۰ نمونه ساکشن دندانپزشکی از مطب‌های دندانپزشکی انجام شد. پس از بررسی و کشت اولیه نمونه‌های ادرار، خون و خلط در محیط‌های کشت بلاداگار (مرک- آلمان)، مک کانکی آگار (شارلو- اسپانیا) و ائوزین متیلن بلوآگار (مرک- آلمان) (۲۰) و مشاهده باسیل‌های گرم منفی، باکتری‌ها در محیط انتخابی استنومدیوم آگار کشت داده شدند (۲۱). در مورد نمونه‌هایی که با سواب گرفته شد و نیز ساکشن دندانپزشکی، ابتدا به محیط تریپتیکیز سوی براث (هایمدیا- هند) منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت، ادامه کار مشابه آنچه که در بالا ذکر شد، انجام شد.

پس از رشد باکتری، تست‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، اکسیداز، اندول، حرکت، سولفید هیدروژن، متیل رد، وژزپروسکوئر، لیزین دکربوکسیلاز، بایل اسکولین (بایو لایف- ایتالیا)، نشاسته، اوره، DNase (هایمدیا- هند) و تخمیر قندها در محیط تریپل شوگر آیرون (مرک- آلمان) آگار انجام شد. جهت استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط LB Broth (شارلو- اسپانیا) استفاده شد. به میزان ۱/۵ میکرولیتر یا ۰/۰۰۱۵ میلی لیتر از این سوسپانسیون به مدت ۱ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه(rpm، revolution per minute) سانتریفیوژ گردید، مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $95^{\circ}C$ حرارت داده و ۲۰ میکرولیتر، Tris ۱mol (pH =۷/۵) HCl اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و در نهایت، مایع رویی به یک میکروتیوب استریل منتقل شد. پس از استخراج DNA، ژن *23S rRNA* به روش real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. این واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و شامل ۵ µl از DNA الگو، ۲µl (۱۰x) بافر، ۰/۶ µl از (۵۰mM) MgCl2، ۰/۴L از (۱۰mM) dNTP، ۰/۴ µl از پرایمر F و ۰/۴ µl از پرایمر R بود (۲۲)، ۰/۴میکرولیتر رنگ Rox و ۰/۹ میکرولیتر از رنگ SyBrgreen، ۰/۲ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase و ۹/۷ میکرولیتر آب دیونیزه بود.

برای انجام واکنش از دستگاه real-time PCR (ABI) استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده شامل:

مرحله اول: ۵ دقیقه در دمای $95^{\circ}C$ و مرحله دوم: ۳۰ ثانیه در دمای $94^{\circ}C$ و ۱دقیقه دردمای $59^{\circ}C$ که ۴۵ مرتبه تکرار شد. شناسایی ژن *rpfF*، با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. این روش در حجم نهایی واکنش، ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل ۵ µl از DNA الگو، ۰/۲ µl از آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱ µl از هر پرایمر F و R ژن *rpfF*، ۰/۵ µl از (۱۰mM) dNTP، ۲/۵ µl از (۱۰x) بافر، ۰/۷۵ µl از (۵۰mM) MgCl2، ۱۴/۰۵ µl آب دیونیزه بود که با یکدیگر مخلوط شدند.

برای انجام واکنش از دستگاه ترموسایکلر (TECHNE- انگلیس) استفاده شد. سیکل حرارتی شامل مرحله واسرشت شدن اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$، ۳۵ مرتبه: واسرشت شدن در دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال به مدت ۱دقیقه در دمای $59^{\circ}C$ و گسترش به مدت ۴۵ ثانیه در دمای $72^{\circ}C$ و گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه دردمای $72^{\circ}C$ انجام شد و محصول PCR الکتروفورز گردید. جدول ۱، مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعه مورد انتظار در روش‌های PCR و real-time PCR را نشان می‌دهد.

جدول۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

منبع	نام ژن	توالی ژن	اندازه محصول bp
۲۲	*23S rRNA*	F: GCTGGATTGGTTCTAGGAAAACGC R: ACGCAGTCACTCCTTGCG	bp۲۷۸
In this sudy	*rpfF*	F: CTGGCTGGCGGTGTAGAGG R:CGAGGAAGGCGTGTTGATGG	bp۱۴۵

آزمون‌های آنزیمی ژلاتیناز، همولیز، لسیتیناز، هیالورونیداز، لیپاز و پروتئیناز جدایه‌های باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* انجام شد (۱۸). برای بررسی بیوفیلم، از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری در محیط LB broth (شارلو- اسپانیا) استفاده شد و پس از این مدت از باکتری‌های مورد نظر، سوسپانسیونی با کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. به میزان ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت LB broth (شارلو- اسپانیا)، داخل چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل، اضافه شد و سپس، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر به چاهک‌ها اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ نگهداری گردید. پس از این مدت، تلقیحها برداشته شده و ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو شدند. در ادامه، داخل چاهک‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده و ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال به هر چاهک اضافه شد و جذب نوری در ۴۹۲ نانومتر بادستگاه الیزاریدر (BioTek- آمریکا) خوانده شد. برای هر نمونه، ۳ تکرار گذاشته شد و نمونه‌ها به صورت زیر طبقه‌بندی شدند:

میانگین جذب نوری= ODC(Optical Density Cut Off)
(انحراف معیار × ۳) + کنترل

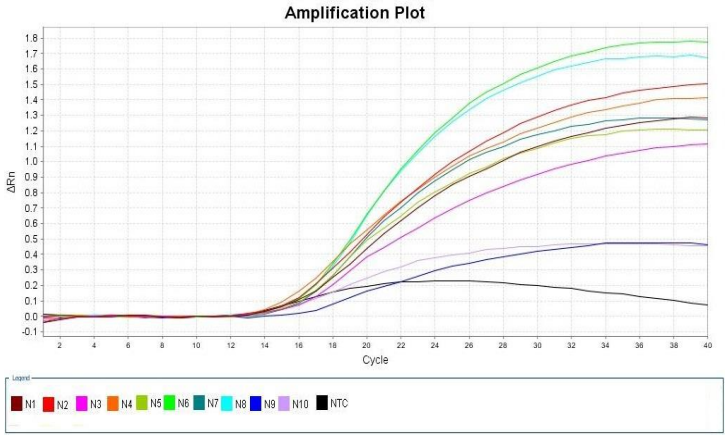
$$OD \leq ODC = \text{عدم تشکیل بیوفیلم}$$
$$ODC < OD \leq (2 \times ODC) = \text{قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف}$$
$$(2 \times ODC) < OD \leq (4 \times ODC) = \text{قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط}$$
$$(4 \times ODC) < OD = \text{قدرت تشکیل بیوفیلم قوی}$$

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.53]

برای تجزیه و تحلیل آماری، از آمار توصیفی (فراوانی، درصد و میانگین)، روش آنالیز واریانس یکطرفه (One- Way – ANOVA) و مقایسه میانگین ها با استفاده از روش آزمون چند دامنه ای دانکن و برای بررسی ارتباط بین متغیرهای مورد بررسی از طریق آزمون‌های ضرایب همبستگی اسپیرمن و پیرسون، استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار درنظر گرفته شد.

یافته ها

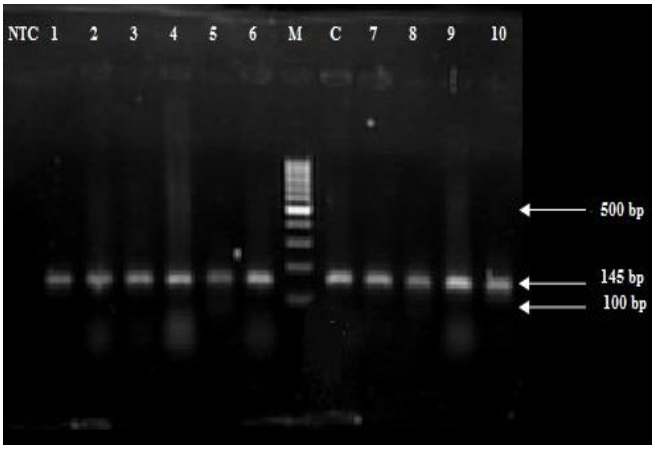
تعداد ۲۰ جدایه باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، جداسازی شد که از این تعداد، از شیر آب بیمارستان ۱ جدایه (۰/۰۵٪)، از ادرار ۱ جدایه (۰/۰۵٪)، ازخون ۱ جدایه (۰/۰۵٪)، از خلط ۴ جدایه (۰/۲٪)، از سیستم مانومتر اکسیژن بیمارستان‌ها ۷ جدایه (۰/۳۵٪) و از لوله پلاستیکی مکش دندانپزشکی ۶ جدایه (۰/۳٪)، بدست آمد. نتایج real-time PCR برای ژن *23S rRNA* در نمودار ۱ نشان داده شده است. ۲۴ نمونه با روش کشت، باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، تشخیص داده شدند که ۴ نمونه از ۲۴ نمونه، با بررسی ژن *23S rRNA* ، مورد تایید قرار نگرفت.



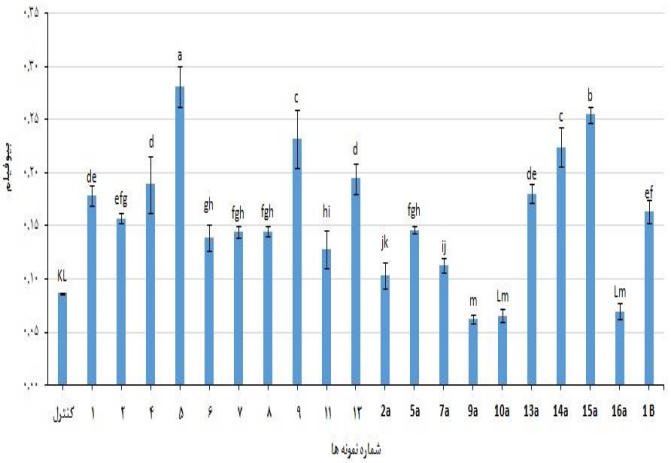
نمودار۱. منحنی تکثیر نمونه‌های مثبت تعیین شده با روش real-time PCR برای ژن *23S rRNA* در باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*

نتایج آزمایش PCR در مورد ژن *rpfF* نشان داد که تمام نمونه‌هایی که با دو روش کشت و real-time PCR، *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* تشخیص داده شدند، واجد ژن *rpfF* بودند و در محدوده bp ۱۴۵، باند تشکیل دادند (شکل ۱). بیشتر جدایه‌های باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* دارای آنزیم‌های ژلاتیناز (۹۰٪)، همولیزین (۸۵٪)، پروتئاز (۷۵٪)، لسیتیناز (۹۰٪)، لیپاز (۷۵٪) و هیالورونیداز (۱۰۰٪) بودند. همبستگی بین متغیرهای همولیزین و لیپاز ($p=۰/۰۰۰$ و$r=۰/۷۴۲$)، همولیزین و لسیتیناز ($p=۰/۰۰۰$ و$r= ۰/۷۸۱$) و لسیتیناز و لیپاز ($p=۰/۰۱۰$ و$r= ۰/۵۷۴$)، معنی‌دار بودند، در حالی که متغیرهای همولیزین و هیالورونیداز، همولیزین و ژلاتیناز، همولیزین و پروتئاز، لیپاز و هیالورونیداز، لیپاز و پروتئاز، لیپاز و ژلاتیناز، پروتئاز و هیالورونیداز، پروتئاز و ژلاتیناز، پروتئاز و لسیتیناز، هیالورونیداز و ژلاتیناز، هیالورونیداز و لسیتیناز، ژلاتیناز و لسیتیناز، فاقد همبستگی معنی‌داری بودند. تشکیل بیوفیلم در ۱۵٪ جدایه‌ها دیده نشد، ۴۵٪ جدایه، قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف،۴۰٪ جدایه، قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط و هیچکدام از نمونه ها، قدرت تشکیل بیوفیلم قوی نداشتند(نمودار ۲). حروف مشابه هم، نشان‌دهنده عدم رابطه معنی‌داری بین نمونه‌ها و حروف غیر مشابه، نشان‌دهنده رابطه معنی‌داری بین نمونه‌ها می‌باشد. نتایج آنالیز آماری، نشان داد که بین دو متغیر رنگدانه ملانین و تولید بیوفیلم ارتباط معنی‌داری دیده نشد ($p=۰/۶۹۲$ و$r= -۰/۰۹۴$) (داده‌های مربوط به تولید رنگدانه نشان داده نشده است).

بین دو متغیر تولید بیوفیلم و حرکت خزیدن، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=۰/۰۰۱$ و$r= -۰/۶۷۴$)، ولی با حرکت کششی ($p=۰/۷۰۴$ و$r= -۰/۰۹۱$) و شناوری ($p=۰/۷۷۸$ و$r= -۰/۰۶۷$) ارتباط معنی‌داری دیده نشده است. (داده‌های مربوط به انواع حرکت نشان داده نشده است).



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *rpfF* در باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*. جدایه ها: ۱۰-۱ کنترل منفی:NTC کنترل مثبت: 100bp ladder C، ستون: M



نمودار۲. نتایج آنالیز آماری تشکیل بیوفیلم جدایه‌های *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*

بحث و نتیجه گیری

جدایه‌های باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، فاکتورهای بیماری‌زایی، از جمله آنزیم‌های خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم را به میزان بالایی دارند، همچنین، دارای ژن *rpfF* بودند که این فاکتورها در بیماری‌زایی باکتری نقش دارد. این

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.53]

باکتری، به طور معمول با استفاده از محیط‌های کشت انتخابی و روش‌های بیوشیمیایی شناسایی می‌شود ولی به کارگیری روش‌های مولکولی به خاطر دقت زیاد، از ارزش خاصی برخوردار است. در این مطالعه، هر دو روش به کار گرفته شد. ۴ نمونه از ۲۰ نمونه‌ای که با روش فنوتیپی، باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، شناسایی شده، با روش مولکولی، منفی شد، می‌توان نتیجه گرفت که گاهی اوقات، ممکن است، روش فنوتیپی خطا داشته باشد و با روش مولکولی، با اطمینان و صحت بیشتری، نتیجه حاصل می‌شود. در مطالعه حاضر، بیشتر جدایه‌های باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* دارای آنزیم‌های ژلاتیناز (۹۰٪)، همولیزین (۸۵٪)، پروتئاز (۷۵٪)، لسیتیناز (۹۰٪)، لیپاز (۷۵٪) و هیالورونیداز (۱۰۰٪) بودند.

در مطالعه‌ای که Thomas و همکارانش انجام دادند، فعالیت ژلاتیناز، همولیزین، لیپاز و پروتئاز در تمامی جدایه‌های مورد مطالعه دیده شدند (۱۸) ولی در مطالعه اخیر، تعداد مختصری از جدایه‌ها فاقد این آنزیم‌ها بودند (ژلاتیناز (۱۰٪)، همولیزین (۱۵٪)، پروتئاز (۲۵٪)، لیپاز (۲۵٪)). در مطالعه Thomas و همکاران، هیچ‌کدام از جدایه‌های مربوط به ادرار، دارای آنزیم‌های لسیتیناز و هیالورونیداز نبودند و همچنین، ۵۶/۵٪ جدایه‌ها از خون، فاقد آنزیم لسیتیناز بودند (۱۸) در مطالعه اخیر، جدایه‌های مربوط به ادرار واجد آنزیم لسیتیناز و هیالورونیداز بودکه با مطالعه Thomas متفاوت بود. همچنین، در مطالعه اخیر، جدایه مربوط به خون، واجد آنزیم لسیتیناز و هیالورونیداز بود که از نظر آنزیم هیالورونیداز، تفاوتی نداشتند و از نظر آنزیم لسیتیناز، در مطالعه Thomas، تعدادی از نمونه‌های خون، واجد آنزیم وبرخی نیز، فاقد آن بودند که نمی‌توان گفت اختلافی دارند. در تحقیقی که توسط Passerini De Rossi و همکاران انجام شد، از ۱۳ جدایه *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* ، تمامی جدایه ها، واجد آنزیم ژلاتیناز و DNase بودند (۲۳) که از نظر آنزیم ژلاتیناز با مطالعه حاضر که ۹۰٪ مثبت بودند، مختصری اختلاف دارد که دلیل تفاوت ها، می‌تواند به شرایط بومی باکتری مربوط بوده باشد. تشکیل بیوفیلم، عاملی است که به بیماری‌زایی باکتری کمک می‌کند. *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* می‌تواند بر روی سطوح زنده و غیرزنده از جمله شیشه، پلاستیک و بافت میزبانی تشکیل بیوفیلم بدهد. رشد باکتری همراه با تشکیل بیوفیلم، مکانیسم دفاعی موثری است که باکتری‌ها برای بقای خود در محیط‌های رقابتی مثل راه هوایی بیماران سیستیک فیبروزیس (CF) به کار می‌گیرند (۲۵و۲۴). در تحقیقی که توسط Samantha Flores-Trevin و همکاران در مکزیک انجام شد، تمامی جدایه‌ها، قادر به تشکیل بیوفیلم بودند، تقریبا، نیمی از جدایه‌ها ۴۷/۹٪ (۵۷/۱۱۹)، تولید کنندگان بیوفیلم ضعیف، ۳۸/۷٪ (۴۶/۱۱۹) جدایه‌ها، تولید کننده بیوفیلم متوسط، و ۱۳/۴٪ (۱۶/۱۱۹) جدایه‌ها، قدرت تشکیل بیوفیلم قوی داشتند (۲۶). در مطالعه حاضر، هیچکدام از جدایه‌ها، قدرت تشکیل بیوفیلم قوی نداشتند، همچنین، ۳ جدایه نیز قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند که با مطالعه Samantha Flores-Trevin متفاوت می‌باشد، ولی در مطالعه اخیر، ۴۵٪ (۹/۲۰) جدایه‌ها، قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف و ۴۰٪ (۸/۲۰) جدایه ها، قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط داشتند که تقریبا با مطالعه Samantha Flores-Trevin مشابهت دارد (۲۶). سیستم کروم سنسینگ موجود در باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، بر پایه مولکول نشانگری به نام عامل نشانه انتشار (Diffusible Signal Factor) (DSF) می‌باشد و تولید DSF به وسیله خوشه ژنی *rpf* کد می‌گردد (۱۹).

در مطالعه حاضر، تمامی جدایه‌ها، واجد ژن *rpfF* بودند، که با مطالعه Huedo و همکاران مطابقت داشت(۱۹). در بیوفیلم تشکیل شده با گونه‌های مخلوط *سودوموناس آئروژینوزا* و *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، نسبت به مواردی که در بیوفیلم تشکیل شده به وسیله گونه منفرد *سودوموناس آئروژینوزا* دیده شد، مشخص گردید که *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* به باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، کمک می‌کند تا ساختاری با شکل‌های مختلف را، گسترش دهد. این یافته‌ها، نشان داد که برای ارتباط بین دو گونه‌ی باکتریایی، DSF لازم است. *سودوموناس آئروژینوزا* و *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، باعث تقویت یکدیگر در تعدادی از مکان‌های محیطی که برخی در ارتباط با گیاهان و برخی در ارتباط با حیوانات است، می‌شوند. (۲۷). Zhuo و همکاران نشان دادند، شیوع ژن *rpfF* در ۲۴ سویه از باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، ۵۰٪ بود، همچنین وجود ژن *rpfF*، ارتباط نزدیکی با تشکیل بیوفیلم داشت ولی تاثیر معنی‌داری بر میزان تشکیل بیوفیلم نداشت. در مطالعه اخیر، تمامی جدایه ها، واجد ژن *rpfF* بودند، که با مطالعه Zhuo متفاوت بود (۲۸). جدایه‌های باکتری، واجد عوامل بیماری‌زای متعددی شامل ژن *rpfF* که تولید کننده عامل نشانه انتشار ضروری برای سیستم کروم سنسینگ باکتری است و آنزیم‌های خارج سلولی متعدد و با میزان بالا بوده‌اند. بیشتر جدایه‌ها، توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند که می‌تواند به بقا باکتری و نیز مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن کمک کند و به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی، لازم است که قبل از درمان، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر صادق فتاحی و سرکار خانم مهندس گالیا امیربزرگی که در انجام کار مولکولی این پژوهش همکاری نمودند، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.53]

The Frequency of Virulence Factor Production in Clinical Isolates of Stenotrophomonas Maltophilia

R. Izadi Amoli (MSc)[1], J. Nowroozi (PhD)*[2], A. Sabokbar (PhD)[1], R. Rajabniya (PhD)[3]

1.Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, I.R.Iran
2.Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, I.R.Iran
3.Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Babol University of Medical sciences, Babol, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(10); Oct 2016; PP: 53-9
Received: Apr 14th 2016, Revised: Jun 1st 2016, Accepted: Sep 26th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Stenotrophomonas maltophilia is known as an emerging bacterium in the world, associated with a wide range of diseases. The aim of this study was to investigate the virulence factors of these bacteria including extracellular enzymes, ability to form biofilm and rpfF gene involved in quorum sensing.

METHODS: This cross-sectional study was conducted using urine samples, blood and sputum samples, swab samples of oxygen manometer system and tap-water of hospitals as well as dental suction. Bacteria identification was done using culture methods and biochemical tests and to confirm the existence of bacteria, presence of 23S rRNA gene was assessed using real-time PCR method. Isolates were studied in terms of gelatinase, hemolysin, hyaluronidase, lecithinase, lipase and protease enzymes using phenotypic method and biofilm formation using microplate method. Moreover, existence of rpfF gene in isolates was investigated using PCR method.

FINDINGS: 100% of isolates contained rpfF gene. Most isolates contained gelatinase (90%), hemolysin (85%), protease (75%), lecithinase (90%), lipase (75%) and hyaluronidase (100%) enzymes. Biofilm formation was not observed in 15% of isolates; 45% of isolates had weak power of biofilm formation; 40% of isolates had moderate power of biofilm formation and none of the isolates had strong power of biofilm formation. Correlation between hemolysin and lipase, hemolysin and lecithinase, and lecithinase and lipase variables was significant.

CONCLUSION: Results of the study demonstrated that bacteria isolates contained various virulence factors including rpfF gene that produce diffusion signal factor which is essential for quorum sensing and were highly capable of producing extracellular enzymes and forming biofilm.

KEY WORDS: *Stenotrophomonas Maltophilia, Rpff Gene, Enzyme, Biofilm.*

Please cite this article as follows:

Izadi Amoli R, Nowroozi J, Sabokbar A, Rajabniya R. The Frequency of Virulence Factor Production in Clinical Isolates of Stenotrophomonas Maltophilia. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(10):53-9.

***Corresponding author: J. Nowroozi (PhD)**
Address: Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, I.R.Iran
Tel: +98 21 22950955
E-mail: NowrooziJ@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.53]

References

1.Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50(4): 1563–89.

2.Hugh R, Leifson E. A Description of the type Strain of pseudomonas maltophilia. Pub Pas Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon. 1963;13(3):133-8.

3.Swings J, de Vos P, van den Mooter M, de Ley J. Transfer of Pseudomonas maltophilia Hugh 1981 to the genus Xanthomonas as Xanthomonas maltophilia (Hugh 1981) comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1983;33(2):409–13.

4.Palleroni NJ, Bradbury JF. Stenotrophomonas, a new bacterial genus for Xanthomonas maltophilia (Hugh 1980) Swings et al. Int J Syst Bacteriol 1983;43(3):606-9.

5.Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with Stenotrophomonas maltophilia. Clin. Microbiol. Rev. 1998;11(1):57−80.

6.Senol E. Stenotrophomonas maltophilia: the significance and roleas a nosocomial pathogen. J Hosp Infect. 2004;57(1):1-7.

7.Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. Int J Antimicrob Agents. 2005;25(2):95-109.

8.Looney WJ. Role of stenotrophomonas maltophilia in hospital-acquired infection. Br J Biomed Sci. 2005;62(3):145–54.

9.Wainwright CE, France MW, O'Rourke P, Anuj S, Kidd TJ, Nissen MD,et al. Cough generated aerosols of pseudomonas aeruginosa and other gram-negative bacteria from patients with cystic fibrosis. Thorax. 2009;64:926-31.

10. Nseir S, Di Pompeo C, Cavestri B, Jozefowicz E, Nyunga M, Soubrier S, et al. Multiple-drug-resistant bacteria in patients with severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: prevalence, risk factors, and outcome. Crit Care Med. 2006;34(12):2959-66.

11. Lai C-H, Lai CH, Chi CY, Chen HP, Chen TL, Lai CJ, Fung CP, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of patients with Stenotrophomonas maltophilia bacteremia. J Microbiol Immunol Infect. 2004;37(6):350-8.

12. Papadakis KA, Vartivarian SE, Vassilaki ME, Anaissie EJ. Stenotrophomonas maltophilia: an unusual case of biliary sepsis. Clin Infect Dis. 1995;21(4):1032-4.

13. Landrum ML, Conger NG, Forgione MA. Trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of Stenotrophomonas maltophilia osteomyelitis. Clin Infect Dis 2005;40(10):1551-2.

14. Akçakaya AA, Sargin F, Erbil HH, Yazici S, Yaylali SA, Mesçi C, et al. A cluster of acute-onset postoperative endophthalmitis over a 1-month period: investigation of an outbreak caused by uncommon species. Br J Ophthalmol. 2011;95(4):481-4.

15. Lin HC, Ma DH, Chen YF, Yeh LK, Hsiao CH. Late-onset intrascleral dissemination of stenotrophomonas maltophilia scleritis after pterygium excision. Cornea. 2011;30(6):712-5.

16. Müller-Premru M, Gabrijelcic T, Gersak B, Kolman J, Svent-Kucina N, Spik V et al. Cluster of stenotrophomonas maltophilia endocarditis after prosthetic valve replacement. Wien Klin Wochenschr. 2008;120(17-18):566-70.

17. AboZahra R. Quorum sensing and interspecies interactions in stenotrophomonas maltophilia. Brit Microbiol Res J. 2013;3(3):414-22.

18. Thomas R, Hamat RA, Neela V. Extracellular enzyme profiling of stenotrophomonas maltophilia clinical isolates. Virulence. 2014;5:(2): 326-30.

19. Huedo P, Yero D, Martínez-Servat S, Estibariz I, Planell R, Martínez P, et al. Two different rpf clusters distributed among a population of Stenotrophomonas maltophilia clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. J Bacteriol. 2014;196(13):2431-42.

20. Brooke JS. Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):2-41.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.53]

21. Goncalves Vidigal P, Grosse-Onnebrink J, Mellies U, Buer J, Rath PM, Steinmann J. Stenotrophomonas maltophilia in cystic fibrosis: Improved detection by the use of selective agar and evaluation of antimicrobial resistance. J Cyst Fibros. 2011;10(6):422-7.
22.Wagner GS, Locosque RP. A specific polymerase chain reaction method to identify Stenotrophomonas maltophilia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(3):390-1.
23.Passerini DR, Calenda M, Vay C, Franco M. Biofilm formation by Stenotrophomonas maltophilia isolates from device-associated nosocomial infections. Rev Argent Microb. 2007;39(4):204-12.
24.Di Bonaventura G, Stepanovic' S, Picciani C, Pompilio A, Piccolomini R. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical stenotrophomonas maltophilia isolates. Folia Microbiol (Praha). 2007;52(1):86-90.
25.Pompilio A, Catavitello C, Picciani C, Confalone P, Piccolomini R, et al. Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of Stenotrophomonas maltophilia from cystic fibrosis. J Med Microbiol. 2010;59(1):76-81.
26. Samantha FT, Jessica LG´ rrez-Ferman RM, Eduardo DE, Catalina RM, Jorge M. et all. Stenotrophomonas maltophilia in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. J Med Microbiol. 2014;63:1524-30.
27.Ryan RP1, Fouhy Y, Garcia BF, Watt SA, Niehaus K, Yang L, Tolker-Nielsen T, Dow JM. Interspecies signalling via the stenotrophomonas maltophilia diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in Pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol. 2008;68(1): 75-86.
28.Zhuo C, Zhao QY, Xiao SN. The impact of spgM, rpfF, rmlA gene distribution on biofilm formation in stenotrophomonas maltophilia. PLoS One. 2014;9(10):1-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.53]