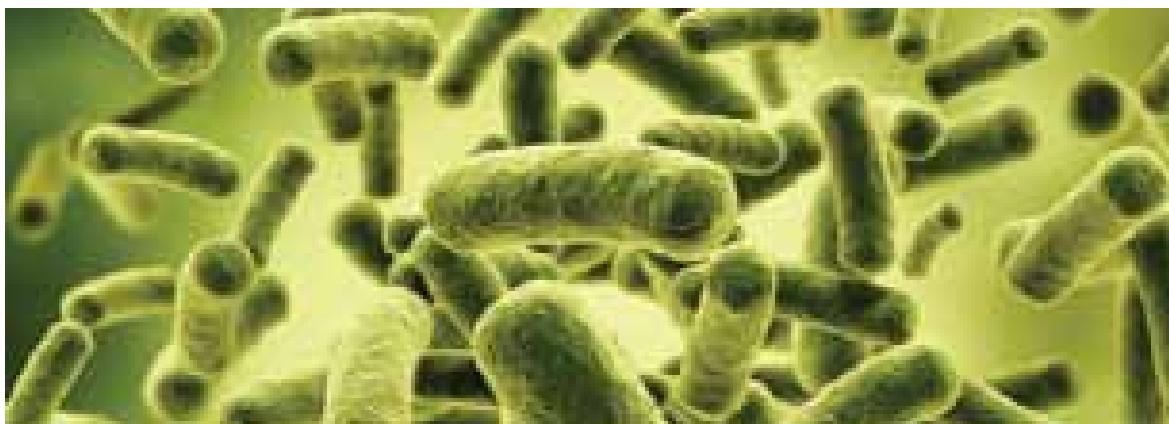


مروری به زیست شناسی باکتری سودوموناس آئروژینوزا

- جاوید تقی نژاد
گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی
ملکان، ایران
J_taghinejad@yahoo.com
- شبنم مولایی کهنه شهری
گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشکده پزشکی و علوم پایه،
دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
- وحید جوان جسور
گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی،
ملکان، ایران
- مهدی حسین زاده
مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)
تهران، ایران



چکیده

زمینه و اهداف: سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی، متحرک، هوازی و باسیلی شکل، شایع ترین بیماری زای انسانی در جنس سودوموناس است. این میکروارگانیسم، همه جایی بوده و در خاک، مواد آلی در حال فساد و در آب وجود دارند. رشد کم باکتری علت توزیع گسترده محیطی آن است. در تعدادی از بیمارستان‌ها سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعه مروری حاضر با کمک موتورهای جستجو Google و مقالات نمایه شده در پایگاه‌های علمی فارسی SID و Magiran و پایگاه‌های علمی انگلیسی Scopus، Google scholar، Ebscohost

و Science Direct بدست آمدند. داده‌ها با استفاده از کلید واژه‌هایی شامل بیولوژی، ساختار، ویروانس و غیره که از تعدادی مقاله، ۵۲ مقاله انتخاب و مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.

یافته‌ها: با بررسی مقالات بدست آمده و بررسی تاریخچه باکتری سودوموناس آئروژینوزا این باکتری جزء میکروب‌های با اهمیت پزشکی، صنعتی و کشاورزی به شمار می‌آید و با توجه به مقاومت دارویی این باکتری پژوهشگران مطالعات فراوانی را انجام داده‌اند و به نتایج مطلوبی رسیده‌اند ولی همچنان جزء چالش‌های پزشکی محسوب می‌شود.

نتیجه گیری: این مقاله سعی در شناخت هر چه بیشتر این باکتری به دانشجویان، اساتید و میکروبیولوژیست‌ها

دارد و پیشنهاد می‌شود با استفاده از تکنولوژی‌های پیشرفته و متدهای جدید راه‌های درمانی جدید و سریع تری را پیدا کرده و به کمک پزشکان و تسریع در روند درمان بپردازند. **کلید واژه ها:** سودوموناس آئروژینوزا، توکسین ها، بیماری زایی

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است. این ارگانیسم نسبت به گروه‌های مختلفی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشد. عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم به علت مقاومت آنتی بیوتیکی ممکن است در نهایت منجر به مرگ شود. این باکتری باسیل گرم منفی، اکسیداز مثبت، متحرک و دارای یک تا سه فلاژل قطبی است. به جز مواقعی که در حضور نیترات رشد می‌کند و آن را به نیتريت احیاء می‌نماید، در سایر موارد هوازی اجباری می‌باشد (۱). سودوموناس آئروژینوزا را در محیط کشت، رنگدانه‌های متعددی تولید می‌کند که عبارت از رنگدانه پیوسیانین (رنگ آبی)، رنگدانه پیوردین (رنگ سبز)، رنگدانه پیوروبین (رنگ قرمز) و پیوملانین (رنگ سیاه) هستند. کلنی آن بوی خاص شبیه انگور یا گل یاس دارد که دلیل آن وجود ماده‌ای به نام آمینواستوفن می‌باشد (۲). فلاژل باعث حرکت، کموتاکسی (Chemotaxis)، اتصال و کلونیزاسیون باکتری به سلول‌ها و مولکول‌های میزبان می‌شود. فلاژل و فلاژلین خالص شده می‌تواند به گیرنده‌های گلیکولیپیدی به ویژه GMI در اکثر غشاهای مخاطی متصل شوند. اخیراً نقش مهم فلاژل به عنوان عامل ایجاد پنومونی حاد (Acute pneumonia) و فلاژلین به عنوان عامل التهاب ریوی در عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا به اثبات رسیده است (۳). این باکتری باعث عفونت‌های جدی مانند سپتی سمی، اندوکاردیت و اوتیت می‌شود. باکتری در طیف وسیعی از محیط‌ها که محل فعالیت انسان است زندگی می‌کند (۴). توانایی این باکتری در تولید فاکتورهای بیماری زایی فراوان همچون آژینات، پروتازها، پیوسیانین، رامنولیپید، فسفولیپاز C، لیپوردین، پیلی جهت اتصال و کلونیزاسیون به سلول‌های میزبان و تشکیل بیوفیلم باعث شده که در زمره مهم ترین پاتوژن‌ها

قرار گیرد (۵). لذا هدف از این مطالعه مروری بررسی زیستی، فیزیولوژیکی و ویرولانسی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

تاریخچه مختصر سودوموناس آئروژینوزا

سال‌ها قبل از آنکه سودوموناس آئروژینوزا شناخته شود، پزشکان آن دوره مشاهده چرک متمایل به رنگ آبی-سبز را نشانه‌ای مهم برای وخیم بودن عفونت تلقی می‌کردند. اولین بار در سال ۱۸۵۰ میلادی سدیلات (Sedillot) حضور لکه‌های رنگ آبی-سبز را بر روی لباس جراحان مورد توجه قرار داد. اما به علت اصلی آن پی نبرد، تا آنکه در سال ۱۸۶۰ میلادی فوردوس (Fordos) موفق به استخراج این رنگ دانه از باکتری شد و ماده کریستالین بدست آمده از آن را پیوسیانین نامید. در سال ۱۸۶۲ میلادی لوک (Luke) این لکه‌های رنگی را در ارتباط با عفونت‌ها اعلام کرد و اظهار داشت که عناصر میله‌ای شکلی را در این چرک‌های آبی-سبز مشاهده کرده است. در سال ۱۸۸۲ میلادی گسارد (Gessard) باکتری سودوموناس آئروژینوزا را جدا نمود و آن را باسیلوس پیوسیانوس نامگذاری کرد، در حالی مدتی بعد یعنی در سال ۱۸۸۹ میلادی چارین (Charrin) نقش بیماری زایی این باکتری را در حیوانات با اهمیت اعلام کرد.

در سال ۱۸۹۴ میلادی میگولا (Migula) مشخصات اولیه سودوموناس آئروژینوزا را بیان کرد. در سال ۱۸۹۶ میلادی وازرمن (Wasserman) اعلام نمود که نقش سم‌ها و مواد خارج سلولی سودوموناس آئروژینوزا از خود سلول باکتری در بیماری زایی آن مهم تر است. اسلر (Osler) در سال ۱۹۲۵ میلادی اظهار داشت که سودوموناس آئروژینوزا احتمالاً در عفونت‌های ثانویه نقش دارد. سودوموناس آئروژینوزا بخاطر پیچیدگی‌های زیاد، تولید فرآورده‌های گوناگون خارج سلولی و عدم اطلاع از چگونگی دقیق بیماری زایی آن به تدریج اهمیت و جایگاه ویژه خود را در علوم بیولوژی و پزشکی پیدا کرده و همگام با تکوین این یافته‌ها، نام‌های گوناگونی را مانند باکتریوم آئروجینوزوم (Bacterium aeruginosom)، باکتریوم آئروجینیوم (Bacterium aerugineum)، میکروکوکوس



پیوسیانوس (*Micrococcus pyocyaneus*)، باسیلوس آئروجینوزوس (*Bacillus aeruginosus*)، باسیلوس پیوسیانوس (*Bacillus pyocyaneus*)، سودوموناس پیوسیانی (*Pseudomonas pyocyanea*)، باکتریوم پیوسیانونم (*Bacterium pyocyaneum*)، سودوموناس پلی کلر (*Pseudomonas polycolor*) برای آن در نظر گرفتند (۶،۷).

جایگاه و طبقه بندی

از سال ۱۸۹۴ میلادی تاکنون که بیش از یک قرن از نامگذاری سودوموناس توسط میگولا می‌گذرد. طبقه بندی سودوموناس‌ها دچار تغییرات و پیچیدگی‌های فراوان بوده است. بسیاری از گونه‌های غیر مربوط در این جنس جای داده شده بودند و به تدریج اصلاحات لازم انجام گرفت. به هر حال هنوز مشکلات مهمی در زمینه طبقه بندی جنس و گونه‌های گوناگون سودوموناس‌ها وجود دارد (۸،۹،۱۰،۱۱). در سال ۱۹۶۶ میلادی استانیر (*Stanier*) و همکارانش، سودوموناس‌های هوازی را براساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای طبقه بندی کردند (۱۱). تلاش برای اصلاح طبقه بندی سودوموناس‌ها و حل مشکلات آن ادامه یافت و مطالعات گسترده‌ای در زمینه اسیدهای نوکلئیک سودوموناس‌ها آغاز شد (۸،۱۲،۱۳). تا آنکه در سال ۱۹۷۳ میلادی پالرونی (*Palleroni*) و همکارانش با استفاده از تکنیک هیبریداسیون DNA-rRNA نشان داده اند که گونه‌های موجود در جنس سودوموناس‌ها را می‌توان به پنج زیر گروه تقسیم نمود. پالرونی مشاهده کرد که به کمک این تکنیک، باکتری‌های موجود در جنس‌های گزانتوموناس‌ها و اش‌ریشیاها ظاهراً مرتبط با گونه‌های موجود در جنس سودوموناس‌ها به نظر می‌رسند و گاهی این شباهت‌ها بیش از شباهت‌های موجود در بین گونه‌های سودوموناس می‌باشد. وی پیشنهاد کرد که با انجام تحقیقات بیشتر و پیدا کردن ویژگی‌ها و شاخص‌های دیگر بتوان این پنج زیر گروه موجود در جنس سودوموناس‌ها را حداقل به پنج جنس مستقل نمود (۱۴). در سال ۱۹۸۳ میلادی دوس (*Deves*) و همکارانش دلی (*De Ley*) با انجام تغییراتی بر روی تکنیک

هیبریداسیون، آزمایش‌های مشابهی را بر روی rRNA گونه‌های مختلف سودوموناس‌ها و گزانتوموناس‌ها انجام دادند و نتایج پالرونی را مورد تایید قرار داده، اعلام نمودند که جنس سودوموناس خود باید به دو یا سه جنس مستقل شود (۱۵). در سال ۱۹۸۴ میلادی ووس (*Woese*) و همکارانش با آزمایشاتی که بر اساس 16SrRNA بر روی سودوموناس‌ها انجام دادند وجود پنج زیر گروه پالرونی را تایید نمودند، اما تاکید کردند که ارتباط دقیق و درستی میان گروه‌های مذکور وجود ندارد (۱۶).

در سال ۱۹۸۹ جانسون (*Johnson*) و همکارش پالرونی به کمک نوع دیگری از روش هیبریداسیون، تشابهات مولکولی میان گونه‌های مختلف سودوموناس‌ها مورد بررسی قرار دادند و ضمن تایید تجربیات گذشته پالرونی، اظهار داشتند که تشابهات مولکول‌های DNA در گونه‌های موجود در جنس سودوموناس در مقایسه با سایر جنس‌ها نسبتاً کمتر است (۱۷).

ویژگی‌های جنس سودوموناس

سودوموناس‌ها یکی از مهم ترین جنس‌های موجود در خانواده سودوموناسه محسوب می‌شوند باکتری‌های موجود در این جنس همگی میله‌ای شکل، مستقیم یا کمی منحنی، گرم منفی غیر اسید فست و بدون اسپور می‌باشند. این باکتری‌ها به وسیله یک یا تعدادی فلاژل قطبی متحرک هستند اما برخی سویه‌ها واجد فلاژل‌های جانبی با طول موج‌های متفاوت نیز می‌باشند، به استثنای گونه سودوموناس مائی (*P. mallei*) که فاقد فلاژل است. بطور متوسط به صورت منفرد، دوتایی و زنجیره‌های کوتاه در زیر میکروسکوپ دیده می‌شوند. از لحاظ نیازمندی‌های غذایی متفاوت بوده تقریباً همگی در حضور نمک‌های آمونیم و یک منبع کربن رشد می‌نمایند. این باکتری‌ها به شدت هوازی بوده از مولکول اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده می‌کنند. برخی از گونه‌های موجود در جنس سودوموناس در حضور نیترات و یا آرژنین قادر به رشد در محیط بی‌هوازی می‌باشند. همه گونه‌های موجود در این جنس کاتالاز مثبت بوده واکنش‌های متیل رد، اندول و وگس - پروسکوئر آن‌ها

می‌باشد. سودوموناس آئروژینوزا به ندرت از آب دریا مگر در اطراف دهانه فاضلاب‌ها جدا شده است و با ایجاد بیماری در ماهی‌ها ارتباطی ندارد.

منابع عمده سودوموناس آئروژینوزا در آب‌های سطحی عبارت از فاضلاب، زهکشی ناشی از طوفان‌ها و مواد آبیکی موجود در محوطه مزارع می‌باشد. تعداد این باکتری در پایین دهانه فاضلاب‌ها به میزان ۱۰۵ باکتری در هر لیتر می‌رسد. گونه‌های این باکتری در خاک و ریزوسفر یافت شده، در نتیجه اغلب از غذاهای سالادی بدست می‌آید. یک گرم خاک ممکن است حاوی ۱۰۰۰-۱۰۰۰ واحد کلنی در هر سانتی متر مکعب باشد. سودوموناس آئروژینوزا میزبان گیاهی خاصی ندارد اما می‌تواند باعث ایجاد بیماری در گونه‌های گیاهی متعددی شامل لوبیا، کاهو و سیب زمینی شود و غالباً نیز از گل داوودی جدا می‌گردد. با این حال این باکتری پاتوژن گیاهی شناخته شده‌ای نیست چرا که قدرت تولید آنزیم‌های پکتینولیتیک را ندارد. الرود (Elrod) و بران (Braun) در سال ۱۹۴۲ نشان دادند که گونه سودوموناس پلی کولر جدا شده از گیاهان شبیه سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

حاملین طبیعی سودوموناس آئروژینوزا در انسان نادر است. در افراد سالم اجتماع، میزان جداسازی از مدفوع بین ۱ تا ۱۵ درصد است و اختلافات مشاهده شده ممکن است ناشی از رژیم غذایی باشد. کلونیزاسیون مدفوعی در افراد سالم ظاهراً از عمر کوتاهی برخوردار است، بعلاوه تغییرات سریع سویه‌ای نیز وجود دارد.

باک (Buck) و کوک (Cooke) در سال ۱۹۶۹ متوجه شدند که خوراندن حداقل یک میلیون سلول سودوموناس آئروژینوزا به افراد داوطلب برای این‌که بتوان باکتری را در مدفوع تشخیص داد ضروری است اما این تعداد جهت کلونیزاسیون کافی نیست. این مقاومت روده‌ای نسبت به کلونیزاسیون را می‌توان به وسیله مصرف همزمان یک آنتی بیوتیک در هم شکست. میزان جداسازی مدفوعی این باکتری در بیماران بستری در بیمارستان طبق گزارش لوپسون (Levison) در سال ۱۹۷۷ تا ۶۰ درصد افزایش می‌یابد. این مساله به عقیده شوتر (Shooter) و همکارانش ارتباط نزدیکی با طول مدت اقامت بیمار در بیمارستان دارد (۷).

منفی است. سودوموناس‌ها قادرند کربوهیدرات‌ها را اکسید کرده بدون تولید گاز، ایجاد اسید نمایند. این باکتری‌ها قادر به انجام واکنش‌های تخمیری و یا فتوسنتتیک نمی‌باشند (۱۸،۱۹،۲۰).

باکتری‌های موجود در این جنس در محیط آبگوشست پیتون با pH اولیه ۵/۵-۸/۵ و درجه حرارت C ۳۰- در مدت ۲۴ ساعت رشد می‌نمایند و برخی گونه‌ها قادرند به رشد در 42C و نیز 4C می‌باشند بسیاری از گونه‌های موجود در این جنس قادر به تولید مواد رنگی هستند. درصد گوانین و ستیوزین (G+C) در مولکول DNA گونه‌های سودوموناس ۵۷-۷۰ mol٪ می‌باشند. برخی سویه‌ها برای انسان و حیوانات بیماری‌زا هستند. گونه اختصاصی تیپ، سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۶۸،۲۱). در میان سودوموناس‌ها تنها گروه فلورسنت شامل سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس پوتیدا (P. putida)، سودوموناس فلورسنتس (P. fluorescens) و نیز گونه غیر فلورسنت سودوموناس استاتزری (P. stutzeri) مورد توجه میکروبیولوژیست‌های پزشکی قرار داشته است. سایر گونه‌های کلینیکی مهم در انسان، در جنس دیگری قرار داده شده‌اند. سودوموناس سپشیا (P. cepacia)، سودوموناس سودومالئی (P. mallei)، سودوموناس پیکتیئی (P. picketii) هم اکنون در جنس Burkholderia قرار دارند.

سودوموناس دیمینوتا (P. diminuta) و سودوموناس وزیکولاریس (P. vesicularis) نیز متعلق به جنس Brevundimonas و سودوموناس مالتوفیلا (P. maltophila) تنها عضو جنس Stenotrophomonas می‌باشد (۷).

محیط زیست سودوموناس آئروژینوزا

در سال ۱۹۹۴ کاسترتون و انوار (Costerton and Anwar) سودوموناس آئروژینوزا را فراوان ترین شکل حیات در روی زمین نامیدند. این باکتری از محیط‌هایی چون آب، سوخت هواپیماهای جت و محلول‌های ضد عفونی کننده به علت توانایی استفاده از انواع متفاوت ترکیبات آلی، جدا شده است و قادر به زیست در غیاب ظاهری مواد غذایی



مورفولوژی و ساختمان سلولی

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی میله‌ای شکل می‌باشد و معمولاً به صورت منفرد، دستجات کوچک یا زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شود. کلنی‌های این باکتری به صورت صاف و گرد بوده و اغلب رنگ فلورستی سبز ایجاد می‌کنند. این باکتری به واسطه یک فلاژل قطبی منفرد حرکت می‌کند. وجود اکسیژن مولکولی برای حرکت ضروری است، بنابراین آزمایش در محیط آگار نیمه جامد روش مناسبی جهت بررسی حرکت نمی‌باشد (۲۲، ۲۳).

غشاء سیتوپلاسمی

وجود اسیدهای چرب در مولکول‌های فسفولیپیدی باعث بروز خاصیت هیدروفوبیک در هر دو سطح بیرونی و درونی غشاء سیتوپلاسمی سلول سودوموناس آئروژینوزا شده است. این ویژگی غشاء سیتوپلاسمی باعث شده تا این غشاء سد موثری در برابر عبور مولکول‌های قطبی محسوب شود، در حالی که مانع موثری در مقابل عبور مولکول‌های آب‌گریز نمی‌باشد. بنابراین مولکول‌های آنتی‌بیوتیک هیدروفوب در صورت گذشتن از سد دیواره سلولی می‌توانند آزادانه از غشاء سیتوپلاسمی سودوموناس آئروژینوزا عبور کرده وارد سلول شوند در حالی که مولکول‌های آنتی‌بیوتیکی آب‌دوست در صورتی قادر به عبور از سد غشاء سیتوپلاسمی این باکتری‌ها هستند، که از سیستم انتقال فعال پروتئین‌های پرمه‌آز که یک سیستم اختصاصی برای انتقال فعال مواد به داخل سلول محسوب می‌شود استفاده کنند (۲۴، ۲۵).

فضای پری پلاسمیک و پپتیدوگلیکان

در فضای پری پلاسمیک سودوموناس آئروژینوزا مقدار زیادی آنزیم‌های تجزیه‌کننده مواد وجود دارد که به وسیله بخش داخلی غشاء سیتوپلاسمی ساخته می‌شوند. این آنزیم‌ها در فضای پری پلاسم به صورت فعال درآمده و مولکول‌های آلی گوناگونی را از منافذ بسیار کوچک غشاء خارجی سلول به این فضا راه پیدا کرده‌اند، تجزیه می‌کنند. از جمله آنزیم‌های مهمی که در فضای پری پلاسمیک سلول سودوموناس آئروژینوزا یافت

می‌شوند، می‌توان به آنزیم‌های تغییر دهنده آنتی‌بیوتیک‌ها مانند بتالاکتامازها، استیلازها، فسفوریلازها و آدنیلازها اشاره کرد. این آنزیم‌ها اغلب پلاسمیدی بوده و به عنوان سد دفاعی موثری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها عمل می‌کنند (۲۶، ۲۷). پپتیدوگلیکان در بخش داخلی دیواره سلولی وجود دارد و یک لایه غیر ارتجاعی می‌باشد. پپتیدوگلیکان در نقاطی به غشاء سیتوپلاسمی متصل است و از قسمت بیرونی نیز توسط مولکول‌های لیپوپروتئینی غشاء خارجی احاطه می‌شود. میزان مولکول‌های پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی سودوموناس آئروژینوزا نسبتاً کم است. از طرفی مولکول‌های لیپوپروتئینی در غشاء خارجی سلول این باکتری نیز بصورت پراکنده و با نسبت کمتری در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم منفی وجود دارد (۲۷).

غشای خارجی

غشاء خارجی در سودوموناس آئروژینوزا از نظر ساختمانی شبیه به سایر باکتری‌های گرم منفی است. در این باکتری مولکول‌های پپتیدوگلیکان به خاطر کمبود نسبی مولکول‌های پروتئینی غشاء خارجی به راحتی در معرض مایعات فضای بیرونی قرار می‌گیرند (۲۴). سودوموناس آئروژینوزا از جمله باکتری‌هایی است که ذاتاً نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشد. عده‌ای از محققین با مطالعاتی که انجام داده‌اند، علت این مقاومت را غیر قابل نفوذ بودن غشاء خارجی این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها اعلام کرده‌اند. این محققین در گزارش‌های خود اعلام کرده‌اند که تاکنون مشاهده نشده که هیچ آنتی‌بیوتیکی بتواند به روش انتقال فعال از غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا عبور نماید (۲۴).

نیکایدو و هنکوک در سال ۱۹۸۶ اظهار کردند که مولکول‌های لیپوپلی ساکارید موجود در غشاء خارجی سلول این باکتری احتمالاً به صورت بسیار فشرده و نزدیک در کنار هم قرار گرفته‌اند و از طرفی ترکیب کاتیون‌های دو ظرفیتی با شاخه‌های فسفات مولکول‌های فسفولیپید در این غشاء و نیز اندازه بسیار کوچک کانال‌های پورینی که به عنوان کانال‌های نفوذی غشاء عمل می‌کنند باعث شده تا غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به

مولکول‌های آب دوست و آب‌گریز آنتی‌بیوتیک‌ها غیر قابل نفوذ شود (۲۷،۲۸).

پروتئین‌های غشاء خارجی

در غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا انواع مختلفی از پروتئین‌ها وجود دارند، مقادیر برخی از این پروتئین‌ها نسبت به بقیه بیشتر است. بیشترین پروتئین پورینی موجود در غشاء خارجی این باکتری پروتئین F است. کمبود این پروتئین باعث از بین رفتن خاصیت نفوذ پذیری غشاء خارجی این باکتری نسبت به یک نوع سفالوسپورین می‌شوند. احتمالاً این پدیده به دلیل بسته شدن بیشتر کانال‌های پورینی در غشاء خارجی در اثر موتاسیون می‌باشد (۲۹،۳۰).

دیواره سلولی در سودوموناس آئروژینوزا از نظر ساختمانی شبیه سایر باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. OprF از نظر ساختمانی مشابه پروتئین OmpA در اشریشیا کلی می‌باشد و به عنوان یک کانال غیر اختصاصی جهت عبور مواد محلول عمل می‌کند. این پروتئین نفوذ پذیری نسبتاً پایینی را به سلول اعطا می‌کند. بسیاری از مواد محلول از طریق کانال‌های اختصاصی از میان غشاء سودوموناس آئروژینوزا عبور می‌نمایند. OprF به شدت آنتی‌ژنیک بوده، می‌تواند به عنوان یک واکنش موثر جهت حفاظت در برابر عفونت‌های بعدی با سودوموناس آئروژینوزا عمل نماید. در غشاء خارجی این باکتری حدود ۸ تا ۵ OMP وجود دارد (۳۱،۳۲).

فلاژل

همه گونه‌های موجود در جنس سودوموناس به استثناء سودوموناس مالئی که فاقد فلاژل است، متحرک بوده و دارای فلاژل هستند. با استفاده از روش رنگ آمیزی اسید تانیک فوشین، می‌توان فلاژل‌ها را رنگ آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری مشاهده کرد. تعداد و محل قرار گرفتن فلاژل‌ها در شناسایی گونه‌های مختلف سودوموناس اهمیت دارد. در برخی از گونه‌های سودوموناس در هر قطب سلول ممکن است از یک تا شش فلاژل دیده شود. به نظر می‌رسد سلول‌هایی که در هر یک از دو قطب دارای

فلاژل هستند به ظاهر در حال تقسیم سلولی می‌باشند. فلاژل‌های جانبی نیز در برخی از گونه‌های سودوموناس مشاهده شده است. احتمالاً فلاژل‌های جانبی تحت کنترل ژن‌هایی جدا از ژن‌های قطبی قرار دارند (۳۳). سودوموناس آئروژینوزا دارای یک فلاژل در یک قطب سلول باکتری می‌باشد ولی گاهی در برخی سویه‌ها دو یا چند فلاژل نیز دیده شده است. برخی از سویه‌های بسیار موکوتیدی سودوموناس آئروژینوزا ممکن است فاقد تحرک و بدون فلاژل باشند در نتیجه میزان تحرک سویه‌های مختلف این باکتری یکسان نمی‌باشد. دو نوع فلاژلین (پروتئین سازنده فلاژل) در ساختمان فلاژل این باکتری وجود دارد: نوع a که هتروژنوس بوده و وزن مولکولی آن 46-52 kDa می‌باشد، نوع b که هموزنوس بوده و وزن مولکولی آن 53 kDa می‌شود (۳۴).

ژن‌های های فلاژل توسط دو ناحیه ژنی وابسته، متشکل از سیستم‌های تعیین کننده متحرک (mot)، حالت (fla)، کموتاکسی (che)، کنترل می‌شوند. ژن fla با فلاژن‌های گونه سودوموناس پوتیدا در انتهای آمین و کربوکسیل پروتئین هومولوژی دارد و اختلاف بین گونه‌ها به بخش مرکزی پروتئین فلاژلین می‌باشد (۳۵).

در سودوموناس آئروژینوزا، فلاژل با بیماری زایی ارتباط دارد. موتان‌های بدون حرکت و فاقد فلاژل به راحتی قادر به ایجاد عفونت در مدل‌های حیوانی نیستند. تهیه واکنش بر اساس پروتئین فلاژلین می‌تواند تا حدی ایجاد مصونیت کند (۳۶).

فیمبریه

اکثر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای فیمبریه یا پیلی می‌باشند که اغلب قطبی و گاهی اوقات پیرامونی می‌باشد. پیلی این باکتری توانایی آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز را ندارد و از این طریق از سایر باکتری‌های روده‌ای متمایز می‌شود. تعداد ۲۰-۵ فیمبریه یا پیلی در یک یا هر دو قطب باکتری قرار دارد (۳۷).

فیمبریه به عنوان گیرنده برخی فازها عمل کرده و همچنین در اتصال باکتری به سلول‌های میزبان نقش دارد. گیرنده اختصاصی برای فیمبریه در سطح سلول‌های میزبان



مشخص نیست اما وجود آن برای بیماری زایی ضروری نیست زیرا سویه‌های فاقد فیمبریه نیز همانند سویه‌های مشابه که دارای فیمبریه هستند قدرت ایجاد بیماری را دارند.

در سودوموناس آئروژینوزا یک نوع پیلی قطبی چند عملکردی به نام پیلی تیپ ۴ وجود دارد که در تشکیل بیوفیلم، اتصال به فاز، ترانسفورماسیون، تغییر جهت، نحوه حرکت و کلونیزاسیون نقش دارد. این پیلی همچنین توانایی اتصال به DNA را دارد (۳۸،۳۹،۴۰).

پیگمان‌ها

در سودوموناس آئروژینوزا حداقل چهار نوع پیگمان پیووردین، پیوروبین، پیوملانین و پیوسیانین شناسایی و شرح داده شده است. پیووردین در آب محلول ولی در کلروفرم نامحلول است. این رنگدانه محیط‌های کشت را به رنگ زرد کم رنگ در می‌آورد و گاهی اوقات به راحتی قابل تشخیص نیست. اکثر ایزوله‌های کلینیکی روی محیط King's B آگار این پیگمان را تشکیل می‌دهند. این ماده رنگی دارای ساختمان غیرفنازینی بوده و لذا در کلروفرم غیر محلول است. پیووردین جاذب بسیار قوی آهن بوده، لذا در محیط‌هایی که میزان آهن در آن‌ها کم است بیشتر تولید می‌شود. پیوروبین یک پیگمان محلول در آب به رنگ قرمز روشن در سودوموناس آئروژینوزا است که درصد کمی از ایزوله‌های کلینیکی تولید می‌کند. سویه‌های تولیدکننده این پیگمان بیشتر از ادرار و خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس جدا شده‌اند. پیوملانین رنگدانه قهوه‌ای مایل به سیاه است که کمتر از ۱ درصد سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا آن را تولید می‌کنند. پیوملانین از نظر ساختار شیمیایی هیچ گونه وابستگی به ملانین حیوانی ندارد (۴۱،۴۲).

پیوسیانین (N-methyle-L-hydroxiphenazine) از نظر شیمیایی جزء فنازین‌ها محسوب می‌شود. این پیگمان در PH اسیدی ابتدا زرد و سپس به قرمز تغییر محیط می‌یابد و در محیط قلیایی بی رنگ می‌شود. اکثر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در محیط King's B پس از گذشت پنج روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد،

تولید پیوسیانین می‌کنند. لازم به ذکر است که انتقال محیط آگار پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به دمای اتاق برای مدت ۴-۳ ساعت باعث افزایش پیگمان زایی می‌شود (۴۱).

ویژگی‌ها و مشخصات کشت

سودوموناس آئروژینوزا از جمله باکتری‌هایی است که به راحتی بر روی محیط‌های معمول باکتری شناسی رشد می‌کند. کلنی‌های تیپ یک این باکتری گرد، دارای لبه‌های نا منظم، ۲-۳ mm قطر با سطح مات، ساختمان داخلی برجسته و قوام کره‌ای می‌باشد. کلنی‌های تیپ دو کوچک‌تر، برجسته و شبیه کلنی‌های کلی فرم‌ها می‌باشند. کلنی‌های تیپ سه خشن، برجسته و کاملاً چروکیده هستند. هر نوع ترکیبی از این اشکال کلنی ممکن است در یک محیط کشت دیده شوند، به طوری که ممکن است با گونه‌های متفاوتی از این باکتری اشتباه گردند.

تمام اشکال موکوئید از کلنی‌های محدب اولیه در طی انکوباسیون طولانی بر روی محیط‌های غنی از یک منبع کربن ایجاد می‌شوند. این کلنی‌ها با کلنی‌های موکوئیدی حاصل از کشت سودوموناس آئروژینوزا به دست آمده از عفونت‌های نظیر سیستیک فیبروزیس متفاوت است، زیرا سطح کلنی‌های موکوئیدی حاصل از این عفونت‌ها توسط مقدار زیادی گلیکوکالیکس یا آلژینات پوشیده شده است. اغلب ایزوله‌های موکوئیدی پیوسیانین تولید نکرده و فاقد فلاژل هستند. کلنی‌های موکوئیدی ممکن است دارای قوام لاستیکی یا مرطوب باشند. اشکال مرطوب اغلب شفاف هستند. برخی از سویه‌های جدا شده از نمونه‌های خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس ایجاد کلنی‌های ریزی می‌نمایند که قابل مشاهده نیستند مگر بعد از ۷۲-۴۸ ساعت دیده شوند. تغییر در اشکال کلنی ممکن است در اثر پاساژ دادن یا تجدید کشت از محیط مایع به جامد ایجاد شود. تفاوت‌های قابل تشخیص در اشکال کلنی‌ها در مورد آنتی‌ژن‌های سوماتیک مقاوم به حرارت، به فاز، حساسیت به باکتریوسین یا آنتی‌بیوتیک مشاهده نشده است (۴۳).

تشخیص سودوموناس آئروژینوزا به وسیله تولید پیگمان سبز-آبی قابل انتشار در محیط کشت مورد تایید قرار

از نمونه‌های مدفوعی توصیه می‌شود (۲۲،۲۳،۴۴).

درجه حرارت و pH مناسب

بهترین درجه حرارت برای رشد سودوموناس آئروژینوزا $37-35^{\circ}\text{C}$ است. pH ایتیم برای رشد این باکتری بین $7/2-7/6$ است. به طور کلی سودوموناس آئروژینوزا توانایی رشد درجه حرارت‌های بین $42-5^{\circ}\text{C}$ را دارد اما در 4°C قادر به رشد نیست. از این ویژگی برای تشخیص و جداسازی این باکتری از سایر گونه‌های فلورستی سودوموناس‌ها می‌توان استفاده کرد (۲۲،۲۳).

متابولیسم

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری هوازی و دارای متابولیسم اکسیداتیو می‌باشد، این باکتری همچنین می‌تواند از سیترات و آرژنین به عنوان پذیرنده الکترون استفاده کند و به صورت بی هوازی نیز رشد نماید. مهم ترین راه متابولیسم گلوکز و سایر هگزوزها در این باکتری مسیر متابولیکی اتنر-دئودروف می‌باشد. از اکسیداسیون قندها مقدار کمی آب و اسید تولید می‌شود. از محیط اکسیداسیون-فرمانتاسیون Hugh & Leifson جهت بررسی تجزیه گلوکز می‌توان استفاده کرد. برای بررسی تولید اسید می‌توان از یک محیط حاوی نمک‌های آمونیم که در آن قند تنها منبع کربن است، استفاده کرد. از طریق اکسیداسیون گلوکونات و تشکیل لعاب در این محیط احیاء نمک‌های تترازولیوم و ایجاد کلنی‌های قرمز احیاء سلنیت و دامیناسیون استامید می‌توان سودوموناس آئروژینوزا را از سایر سودوموناس‌های فلورسنت تشخیص داد. ترکیبات کربن دار دیگری نظیر هیدروکربن‌های آلفاتیکی، اسیدهای کربوکسیلیک، هیدروکسی اسیدها و ترکیبات آروماتیک نیز ممکن است برای رشد این باکتری مورد استفاده قرار گیرند. چرخه اسید تری کربوکسیلیک اصلی ترین روش تنفسی این باکتری محسوب شده که در ضمن آن مواد حد واسط لازم برای بیوسنتز ترکیبات دیگر نیز فراهم می‌گردد. از طرفی چرخه گلی اکسیلات به کمک آنزیم‌های کلیدی مربوط یعنی ایزوسیترات لیاز و مالات سنتتاز، مواد حد واسط لازم را برای چرخه اسید تری کربوکسیلیک

می‌گیرد. در برخی کشت‌ها ممکن است پیوسیانین تولید نشود، مگر بر روی محیط کشت اختصاصی و در برخی از سویه‌ها نیز بطور کلی پیوسیانین تولید نمی‌شود. اغلب محیط‌های کشت مربوط به سودوموناس آئروژینوزا به دلیل تولید ماده 0-آمینواستوفنن از تریپتوفان یک بوی مطبوع میوه‌ای دارند. این باکتری بر روی محیط مکانیکی آگار به خوبی رشد می‌کند. برخی از سویه‌ها نیز بر روی آگار خون دار ایجاد همولیز منتشر می‌کند که باعث قهوه‌ای شدن محیط کشت می‌گردد. رشد در محیط مایع بعد از ۲۴ ساعت به خوبی صورت می‌گیرد. در محیط کشت مایع اغلب حلقه سفید رنگی از مواد لزج چسبیده به جدار شیشه مشاهده می‌شود. پیگمان سبز رنگ نیز بیشتر در سطح مایع دیده می‌شود (۲۲،۲۴).

از خصوصیات تغذیه‌ای و توانایی سودوموناس‌ها در استفاده از مواد آلی گوناگون می‌توان در طبقه بندی و تفکیک گونه‌های موجود در این جنس بهره گرفت. به عنوان مثال سودوموناس آئروژینوزا قادر است از گرانول و استامید به عنوان تنها منبع کربن استفاده کرده و رشد نماید، در حالی که تعداد کمی از سایر گونه‌های موجود در این جنس توانایی انجام این کار را دارند. برای کشت و جداسازی سودوموناس آئروژینوزا از سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها از محیط‌های انتخابی مانند محیط آگار حاوی استیل تری آمونیم بروماید یا استریماید، محیط آگار حاوی ۲ و ۴-تری کلرو-۲-هیدروکسی دی فنل اتر یا ایرگاسان و محیط آگار حاوی کلرواکسیلنول یا دتول استفاده می‌شود. در محیط آگار حاوی استریماید ممکن است عوامل ضد میکروبی نظیر نالیدیکسیک اسید یا نیتروفورانثوئین نیز اضافه شود. همچنین می‌توان با افزودن عوامل ضد میکروبی مانند نوویوسیون، پنی سیلین، سیکلو هگزامید و یا فوشین بازی، نالیدیکسیک اسید و نیتروفورانثوئین به محیط آگار معمولی، محیط انتخابی مناسبی را برای کشت سودوموناس آئروژینوزا فراهم کرد. با این حال باید در نظر داشت که برخی از ایزوله‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سیستم فیروزیس به شدت حساس به این ترکیبات بوده لذا بر روی چنین محیط‌هایی رشد نخواهند کرد. غنی سازی در محیط مایع حاوی استریماید جهت جداسازی این باکتری



فراهم می‌کند. بسیاری از آمینو اسیدها می‌توانند برای رشد سودوموناس آئروژینوزا به عنوان منبع کربن، نیتروژن و انرژی مورد استفاده قرار گیرند، اما متیونین فقط به عنوان منبع نیتروژن بکار می‌رود (۲۲،۲۳،۴۴،۴۵).

ویژگی‌های بیوشیمیایی سودوموناس آئروژینوزا

سودوموناس آئروژینوزا اغلب به بسیاری از آزمایش‌هایی که معمولاً برای تشخیص باکتری‌های گرم منفی تخمیر کننده کربوهیدرات‌ها انجام می‌شود، پاسخ منفی نشان می‌دهد. برای مثال این باکتری اندول استیل متیل کاربینول و H_2S تولید نکرده و آزمایش‌های وگس - پرسکائر (VP)، متیل رد (MR)، لاکتوز، مالتوز و سوکروز آن نیز منفی می‌باشد (۴۵). مهم‌ترین آزمایش‌های بیوشیمیایی برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا به شرح زیر می‌باشند:

واکنش‌های هیدرولیتیک

سودوموناس آئروژینوزا قادر است با تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده، مواد و سویستراهای مختلف را هضم کند. این باکتری ژلاتین را با سرعت ذوب کرده و آمونیاک تولید می‌کند. همچنین این باکتری می‌تواند با تولید آنزیم‌های لپاز، لسیتیناز و اوره آز به ترتیب سوربیتان منوولئات پلی اکسی اتیلن یا توئین ۸۰، زرده تخم مرغ و اوره را هیدرولیز کند. اما قادر به هیدرولیز نشاسته، پلی - بتا- هیدروکسی بوتیریک اسید، اسکولین و ONPG نمی‌باشد (۲۲،۴۵).

واکنش‌های احیاء نیترات

سودوموناس آئروژینوزا قادر به مصرف نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن بوده و دارای سیستم‌های متابولیکی احیاء و تبدیل نیترات به سایر ترکیبات آمین دار می‌باشد. این واکنش که به نام واکنش احیاء نیترات نامیده می‌شود با پیدایش نیتريت در محیط کشت مشخص می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا همچنین قادر است احیاء نیترات را ادامه داده و آن را به اکسید نیترو و در نهایت به گاز نیتروژن تبدیل نماید. این واکنش دنیتریفیکاسیون نامیده می‌شود (۲۲،۴۵).

واکنش آرزین دهمیدرولاز

سودوموناس آئروژینوزا قادر است در شرایط بی هوازی از آرزین به عنوان پذیرنده الکترون استفاده کرده و آن را به عنوان تنها منبع کربن مصرف کرده و رشد نماید. این آزمایش برای تشخیص گونه‌های مختلف سودوموناس‌ها از یکدیگر بسیار با ارزش است و حتی در طبقه بندی این گونه‌ها از یکدیگر مورد توجه قرار گرفته است. برای انجام این آزمایش از ناپدید شدن آرزین و یا پیدایش اورنیتین در محیط کشت استفاده می‌شود. البته می‌توان از تغییرات PH که کمتر اختصاصی می‌باشد نیز استفاده کرد (۲۲،۴۵).

واکنش‌های تجزیه آروماتیک

سودوموناس آئروژینوزا دارای مکانیسم‌های هیدروکسیله کردن برای تجزیه ترکیبات آروماتیک به صورت ارتو می‌باشد. مکانیسم‌های شکافتن حلقه ترکیبات آروماتیک به وسیله سودوموناس‌ها که با دو روش ارتو و متا انجام می‌پذیرد، از نظر طبقه بندی و شناسایی آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۲۲،۴۵).

واکنش‌های اکسیداسیون کربوهیدرات‌ها

بیشتر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا گلوکز را در محیط پایه $1\% (W/V)$ (Of Basal Medium) اکسید کرده، بدون ایجاد گاز، اسید تولید می‌کنند. این باکتری همچنین قادر است این واکنش را در محیط‌های حاوی فروکتوز، گالاکتوز، مانوز، رامنوز، گزیلوز و مانیتول انجام دهد، در حالی که آزمایش‌های لاکتوز، سوکروز و مالتوز آن منفی است (۲۲،۴۵).

واکنش‌های دکربوکسیلاز

سودوموناس آئروژینوزا توانایی دکربوکسیله کردن لیزین و اورنیتین را ندارد. از این رو آزمایش‌های لیزین دکربوکسیلاز و اورنیتین دکربوکسیلاز در مورد این باکتری منفی می‌باشد (۲۲،۴۵).

واکنش‌های اکسیداز و کاتالاز

سودوموناس آئروژینوزا و بیشتر گونه‌های سودوموناس

اکسیداز و کاتالاز مثبت هستند. آئروموناس‌ها و ویبریوها نیز اکسیداز مثبت هستند، از این رو ممکن است با سودوموناس اشتباه شوند اما برخلاف سودوموناس‌ها قادر به تخمیر گلوکز بوده و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد (۲۲، ۴۵).

حساسیت نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی

سودوموناس آئروژینوزا در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت از بین می‌رود. لذا مقاومت خاصی در برابر گرما ندارد. این باکتری قادر است ماه‌ها در دمای محیط در داخل آب زنده بماند و به حیات خود ادامه دهد. این باکتری نسبت به بسیاری از مواد شیمیایی مقاوم است. سودوموناس آئروژینوزا در بسیاری از محلول‌های شیمیایی و ضد عفونی‌کننده‌های موجود در بیمارستان‌ها و نیز در محلول‌های چشمی به راحتی یافت می‌شود. لذا توصیه شده است در این محلول‌ها از فنل اتانول همراه با یک محلول ضد عفونی‌کننده وسیع‌الطیف مانند بنزالکونیوم کلراید و یا کلرو هگزیدین، کلروکرزول و برخی ترکیبات مرکب موثر مانند EDTA-بنزالکونیوم و EDTA-کلروکرزول استفاده شود. گونه‌های مختلف این باکتری از مقاومت نسبی در برابر ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم به ویژه استریماید، دتول و بنزالکونیوم کلراید برخوردار هستند. این باکتری از صابون‌ها و کرم‌های حاوی هگزاکلروفن، محلول‌های پوویدون-آیودین و کلرهگزیدین جدا شده است. سیدکس به شکل محلول قلیایی ۲ درصد گلو تار آلدئید، ماده موثر علیه این باکتری می‌باشد. این ارگانسیم به اسید و نمک‌های نقره نیز حساس است. همچنین اکثر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به پارا آمینو بنزن سولفونامید (مافنید) و سولفادیازین نقره حساس هستند (۲۲، ۲۳).

فاکتورهای ویروالانس پروتئازها

اکثر ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا آنزیم‌های پروتئولیتیکی را تولید می‌کنند که قادر به هضم مواد مختلفی چون کازین، الاستین، ژلاتین، کلاژن و فیبرین می‌باشد. حداقل سه نوع پروتئاز شناخته شده است: پروتئاز

عمومی، آلکالین پروتئاز (AP) و الاستاز (PE) که بوسیله pH اپتیمم، ویژگی سوبسترا و خواص فیزیکی از یکدیگر تشخیص داده می‌شوند. AP دارای وزن مولکولی 48kda. نقطه ایزوالکتریک (PI) 4/1 و حداکثر فعالیت آن در pH ۸-۹ است. AP یک متالوپروتئاز است. اما کوفاکتور فلزی آن ناشناخته می‌باشد برعکس PE، دارای وزن مولکولی 54 kda است که ضمن عبور از غشای داخلی و پری‌پلاسم، با تغییر ساختمان شیمیایی بصورت یک متالوپروتئاز 39 kda وابسته به فلز روی (PI 5/9) در انتهای فاز لگاریتمی یا در مرحله رکود ترشح می‌گردد. PH اپتیمم PE ۸-۷ می‌باشد. AP جهت حداکثر فعالیت خود نیازمند به کلسیم یا کبالت می‌باشد و بوسیله چلاتورها غیر فعال می‌گردد (۴۶، ۴۷).

فعالیت PE نیز در حضور چلاتورها، فلزات سنگین و عوامل احیا کننده متوقف می‌شود. PE از لحاظ عملکرد شبیه متالوپروتئازهای باکتریایی دیگر مثل متالوپروتئازهای لژینونلا پنوموفیلا می‌باشد. به طور کلی AP نسبت به PE بر روی محدوده وسیع تری از مواد موثر است. اما هر دو پروتئین‌های ساختمانی ماتریکس خارج سلولی مثل کلاژن، لامینین و الاستین را هضم می‌نمایند. این دو آنزیم همچنین بر روی تعدادی از ترکیبات پلی پپتیدی مربوط به دفاع میزبانی به سیستم‌های کوآگلوتیناسیون، فیبرینولیز، کمپلمان و سیتوکین، موثر می‌باشد. ژن ساختمانی PE بنام LasR، ابزار دو پروتئین LasA و LasB را کنترل می‌نماید. انواع آلومرفیک LasR نیز احتمالاً وجود دارند.

در میان پروتئازها، اعتقاد بر این است که PE عامل تخریب و آسیب‌های عروقی است که اغلب همراه با هموراژی می‌باشد. کراتیت وابسته به عملکرد پروتئازها است اما موتانت‌های ایزوژنیک فاقد پروتئاز می‌توانند منجر به آسیب‌های قرنیه در مدل‌های حیوانی تجربی گردند. پروتئازها همچنین در پروسه بیماری زایی تنفس نیز شرکت دارند. PE نفوذ پذیری اپی تلیوم تنفسی را به واسطه حمله پروتئولیتیک به اتصالات محکم بین سلولی، افزایش می‌دهد و باعث قطع حرکات مژه‌ای و جدایی سلول‌های اپی تلیال از سلول‌های مجاور غشاء پایه می‌شود. در زخم‌های سوختگی شواهد بسیاری حاکی از نقش



بسیار مهم پروتئازهای سودوموناس آئروژینوزا می باشد:

الف) سویه‌های فاقد پروتئاز معمولاً از ویرولانسی کمتری نسبت به سویه‌های تولید کننده پروتئاز در مدل‌های موشی دچار سوختگی برخوردارند.

ب) آنتی بادی اختصاصی و ممانعت شیمیایی فعالیت پروتئازی، منجر به افزایش بقاء حیوانات آلوده به سویه‌های تولید کننده پروتئاز می گردد.

ج) پروتئازها منجر به رها سازی آمینواسیدها و پپتیدهای غذایی از بافت‌های دچار سوختگی می شوند. همچنین هولدر (Holder) و نیلی (Neely) در سال ۱۹۸۹ نشان دادند که پروتئازهای سودوموناس آئروژینوزا باعث فعالیت فاکتور میزبانی هاگمن (پروآنزیم سرمی) می شود که در آسیب‌های حرارتی، منجر به عدم کنترل کمپلمان و مسیرهای آبشاری لخته شده باعث تجمع پروستاگلان‌دین‌ها و متعاقباً التهاب بافتی می شود (۴۸).

همولیزین‌ها

سودوموناس آئروژینوزا تولید دو نوع همولیزین مشخص می نماید، یکی آنزیم حساس به حرارت بنام فسفولپاز C (PLC) و دیگری رامنولپید مقاوم به حرارت. PLC یک پروتئین 78 kda است که فسفاتیدیل (لیسیتین) موجود در غشاء اریتروسیت‌ها و سورفاکتانت ریوی در انسان را به فسفوریل کولین و دی آسیل گلیسرول هیدرولیز می نماید. این آنزیم همچنین، بر روی اسفنگومیلین نیز موثر است. یک اپرون به سه ژن مسئول کنترل تولید PLC می باشد، ژن PlcS ساختمانی است ولی PlcR1 و PlcR2 پروتئین‌هایی را کد می نمایند که باعث تغییر ساختمانی شیمیایی PLC بعد از ترجمه شده، قدرت همولیتیک آن را افزایش می دهد.

آنزیم PLC دیگری، 73 kda وزن داشته، بر روی فسفاتیدیل کولین موثر است اما همولیتیک نمی باشد. این آنزیم را به منظور تشخیص از انواع همولیتیک (PLC-H) بصورت PLC-N نامگذاری نموده‌اند. موقعیت ژن PLC-N بر روی کروموزوم کاملاً متمایز از PLC-H می باشد. PLC-N در شرایط محدودیت فسفات به میزان بیشتری تولید می شود در حالی که تولید PLC-H تا چنین

حدی در حضور فسفات مهار نمی شود. هر دو نوع PLC باعث ایجاد کدورت در محیط رشد باکتری بر روی آگار زرده تخم مرغ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد می شوند. این آنزیم‌ها را می توان به وسیله هیدرولیز پارانیتر و فنیل فسفوریل کولین (NPPC) مورد سنجش کمی قرار داد. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد اکسیژن در تولید PLC دخالت دارد و تولید حداکثر آنزیم به خوبی وابسته به میزان هوادهی محیط کشت می باشد.

PLC در ریه مبتلایان به سیستمیک فیبروزیس و تمام بیماران کلونیزه شدن مزمن بوسیله سودوموناس آئروژینوزا تولید شده، تیر آنتی بادی علیه آنزیم را افزایش می دهد. فعالیت فسفولپازی باعث رها سازی دی آسیل گلیسرول می شود که وقتی بوسیله لیپازهای باکتریایی یا میزبانی شکسته شود منجر به ایجاد اسید آراشیدونیک می شود که خود پیش ساز بسیاری از مدیاتورهای التهابی است.

همولیزین رامنولپیدی پاسخ‌های شیمیوتاکسیک لکوسیت‌ها را در محدوده‌های تحت توکسیک تغییر داده، ویژگی‌های الکتروشیمیایی اپی تلیوم برونش را عوض می نماید. این آنزیم همچنین باعث معیوب ساختن عملکرد سلول‌های مژه دار تنفسی در ریه‌های افراد مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، آلوده به سودوموناس آئروژینوزا می شود. یک مجموعه ژنی مسئول کدگذاری یک پروتئین تنظیمی بنام RhlR و یک رامنوسیل ترانسفراز (RhlAB) است که هر دو برای سنتز رامنولپیدی ضروری است (۲۲، ۴۴).

لیپازها

اکثر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا لیپولیتیک هستند و باعث هضم انواع چربی‌های ۸۰ و ۲۰ Tween می شوند. لیپاز خارج سلولی در انتهای فاز لگاریتمی رشد ترشح می شود و به نظر می رسد اتصال محکمی با LPS باکتری دارد. ژن ساختمانی لیپاز خارج سلولی سویه PAO1 از سودوموناس آئروژینوزا بنام lipA پروآنزیمی با ۳۱۱ آمینواسید را کد می کند که پیش بینی می شود وزن مولکولی آن 30/1 kda و نقطه ایزوالکتریک آن ۵/۶ می باشد. ژن lipA خاص سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس آلکالیجنس می باشد. در یک قاب خواندن باز بنام lipH

را می‌دهد که دارای ساختمانی سه بعدی واجد سه دومن مجزا می‌باشد.

اگزوتوکسین A اگرچه از لحاظ عملکرد شبیه توکسین دیفتری است اما این دو کاملاً غیر وابسته می‌باشند. ETA به وسیله ۹۰٪ ایزوله‌های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا در شرایط فقر آهن تولید می‌شود و به وسیله یک نسخه از یک ژن ساختمانی بنام *toxA* کدگذاری شده، توسط ژن‌های *regA* و *regB* کنترل می‌شود. هر دو ژن ساختمانی و تنظیمی در ریه بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس ابراز می‌شود. سویه‌های تولید کننده مقادیر بالای توکسین نیز در این شرایط دیده شده است. ETA توکسیک ترین پروتئین شناخته شده در میان گونه‌ها بوده، LD_{۵۰} آن در موش ۳ μg/kg می‌باشد و ظاهراً ویژه سودوموناس آئروژینوزا است. در حالت طبیعی پرو و آنزیم غیر فعال است اما در شرایط *in-vivo* بوسیله دنا تورا سیون و احیاء آنزیم به فرم فعال در می‌آید. مکانیسم چنین تغییری در شرایط *in-vivo* مشخص نیست. پروتئین خالص برای انواع مدل‌های حیوانی به شدت توکسیک است و باعث کاهش فشار خون و شوک، نکروز کبدی و لکوپنی می‌شود. ETA از لحاظ بافت شناسی باعث تخریب کلاژن از دست رفتن مواد دارای زمینه پروتئوگلیکان و مرگ سلول‌های اپی تلیال و اندوتلیال می‌شود. توکسین از طریق یک مسیر اندولیتیک وابسته به گیرنده وارد سلول می‌شود و میزان چنین گیرنده‌هایی، تنظیم کننده شدت حساسیت به توکسین می‌باشد (۵۰).

ETA همچنین به عنوان میتوزن لنفوسیت‌های T و القاء کننده ایترلوکین -۱ عمل می‌نماید توکسین به طور مطلق با بیماری زایی یک سویه ارتباطی ندارد، هم چنانچه برخی ایزوله‌های کلینیکی فاقد ژن ساختمانی کدکننده توکسین هستند. اما موتانت‌ها اغلب دارای نقص پلیوتروپیک در خصوص چندین محصول خارج سلولی دیگر مثل الاستاز، آلكالین فسفاتاز و فسفولیپاز C نیز هستند که شامل آلكالین پروتئاز یا اگزوانزیم S نمی‌شود. با این حال میازاکی (Miyazaki) و همکارانش در سال ۱۹۹۵ دریافتند که قدرت بیماری زایی سویه تولید کننده ETA، ۲۰ بار بیشتر از موتانت ایزوژنیک فاقد توکسین

که یک پروتئین لیپوفیلیک را کد می‌نماید، جهت ابراز آنزیم لیپاز فعال در سویه PAOI ضروری است.

به عقیده راگر (Jaeger)، خوارزمی (Kharazmi) و هویبی (Hoiby) در سال ۱۹۹۱، سودوموناس آئروژینوزا لیپاز را بصورت میسل‌های هتروژنوس لیپاز - لیپوساکاریدی با وزن مولکولی حدود 100-1000 kda و قطری معادل 5-20nm رها می‌سازد. این محققین موفق به خالص سازی یک لیپاز مونومریک با وزن مولکولی 29 kda شدند که قادر به مهار شیمیوتاکسی مونوسیت‌ها می‌باشد (۴۸).

سیدروفورها

سودوموناس آئروژینوزا به منظور تکثیر در شرایط فقر آهن در بافت‌های میزبانی نیاز به استفاده از حداقل سه ترکیب سیدروفوری مختلف بنام‌های، پیوچلین، پیووردین و فری باکتین دارد. سنتز پیووردین جهت رشد ارگانسیم در سرم انسانی از اهمیت بیشتری برخوردار است، در حالی که دو ترکیب دیگر باعث تحریک رشد در شرایط فقر آهن می‌گردند.

مطالعات نشان داده است که پیووردین جهت ویرولانسی سودوموناس آئروژینوزا ضروری است و بطور مستقیم با ترانسفرین جهت آهن رقابت می‌نماید و برای گردآوری آهن در شرایط *in vivo* و ویرولانسی در مدل‌های موشی دچار سوختگی ضروری است. فعالیت سیدروفوری سالیسیلات (پیش ساز پیوچلین) نیز در سودوموناس آئروژینوزا مشخص شده است (۴۹).

اگزوتوکسین‌ها

توکسین کشنده سودوموناس آئروژینوزا بنام اگزوتوکسین A (ETA)، قطعه آدنوزین ۵' - دی فسفات - ریبوزیل (ADP - ریبوز) را از NAD⁺ به فاکتور طویل کننده (EF-2) منتقل می‌نماید. این واکنش باعث غیر فعال EF-2 و خاتمه طویل شدن زنجیره پپتیدی شده، منجر به مهار سنتز پروتئین و مرگ سلولی می‌شود. اگزوتوکسین A شامل دو قطعه A و B به ترتیب با وزن مولکولی 36 kda , 21 بوده، مجموعاً تشکیل یک زنجیره پلی پپتیدی منفرد با ۶۱۳ آمینو اسید و وزن مولکولی 66.5 kda



می‌باشد. آنتی بادی ضد ETA در حیوانات آلوده به سوبه‌های توکسین‌زا مصنوعیت ایجاد می‌کند. واکنش‌های تهیه شده از ETA تنها، از قدرت مصنوعیت زایی ضعیفی برخوردارند.

پاولوسکیس (Pavlovskis) و همکارانش در سال ۱۹۸۱ نشان دادند که ایمونیزاسیون فعال با فرمالین توکسوئید حداکثر میزان مصنوعیت را در موش‌های دچار سوختگی ایجاد می‌کند، در حالی که گلو تارائید توکسوئید قادر به ایجاد چنین مصنوعیتی نیست. بعلاوه در صورت به کار بردن هر دو توکسوئید با یکدیگر نیز میزان آنتی توکسین ایجاد شده یکسان است. کریز (Cryz)، فارز (Furez) و ژرمانیر (Germanier) در سال ۱۹۸۳ توانستند مصنوعیت پاسو قابل توجهی را علیه عفونت‌های کشنده سودوموناس آئروژینوزا به وسیله آنتی توکسین ایجاد نمایند، اما واکنش‌های افراد با کونژوگه پلی ساکارید A-O منجر به ایجاد آنتی بادی‌های ضد توکسین دائمی می‌گردد. آگرو توکسین S نیز یک ADP-ریبوزیل ترانسفراز است اما باعث تغییر EF-2 نمی‌شود، بلکه باعث مونی ADP-ریبوزیل شدن یک پروتئین فیلامانی بنام ویتین مثل پروتئین‌های متصل به GTP از یک محصول انکوژنی می‌گردد. ETS به دو فرم 53 و 49 kda تولید می‌شود که فرم 53 kda آن از لحاظ آنزیمی فعال نیست. ETS از لحاظ ایمونولوژیک متمایز از ETA بوده از سمیت بسیار کمتری در موش برخوردار است.

تنها ۴۰٪ ایزوله‌های کلینیکی در شرایط *in-vitro* ایجاد ETS می‌کنند، در حالی که ۴۰٪ ایزوله‌ها در بدن انسان آن را تولید می‌نمایند، که می‌توان وجود آن را به وسیله روش ایمونوبلاتینگ به کمک سرم بدست آمده از بیماران بهبود یافته از باکتری سودوموناس آئروژینوزا نشان داد. یک سیتوتوکسین اسیدی با وزن مولکولی 25 kda توسط لوتز (Lutz) در سال ۱۹۷۹ شناسایی شد. این توکسین، غشاء پلاسمایی بسیاری از سلول‌های پستانداران را با تغییر ترکیب فسفولیپیدی غشاء مورد حمله قرار می‌دهد. این عمل باعث القای سیستم انتشار به خارج کلسیم شده که خود منجر به تراوش سلولی و افزایش نفوذپذیری نسبت به یون‌ها و تولید پروستاگلین می‌شود.

این توکسین در فضای پری پلاسمیک باکتری به فرم غیر فعال یا ضعیف حضور دارد، اما تحت تاثیر فعالیت پروتئازها به فرم توکسین فعال دیده می‌شود. این سیتوتوکسین احتمالاً همان پروتئین کلوسیدین است که قبلاً توسط شارمن (Scharman) در سال ۱۹۷۶ شناسایی شد. این توکسین به وسیله ۹۵٪ سوبه‌ها تولید می‌شود و موتانت‌های فاقد آن از توکسیسیتی بسیار پایین تری در مدل موشی برخوردار هستند (۵۱).

ادهسین‌ها

اتصال سودوموناس آئروژینوزا به سلول‌های میزبان و در نتیجه کلونیزاسیون آن به واسطه ادهسین‌ها انجام می‌شود. حداقل دو نوع ادهسین در این باکتری وجود دارد: (۱) ادهسین‌های پیلوسی (۲) ادهسین‌های غیر پیلوسی.

ادهسین‌های پیلوسی یا پیلی در سودوموناس آئروژینوزا همان پیلی تیپ چهار است و از طریق فنیل آلانین متیله شده‌ای که در زیر واحدهای پیلین وجود دارد شناسایی و مشخص می‌گردند. باکتری از طریق پیلی به گانگلیوزیدهای GM1 که در سطح سلول‌های میزبان وجود دارند متصل می‌شود. گیرنده‌های گانگلیوزیدی GM1 به طور معمول در انتهایشان توسط اسید سیالیک پوشیده شده‌اند. سودوموناس آئروژینوزا همچنین یک نور آمینیداز تولید می‌کند که انتهای اسید سیالیک را از گیرنده‌های گانگلیوزیدی جدا نموده و بدین طریق سبب افزایش اتصال باکتری به سلول‌های پوششی می‌گردد. پیلی در سودوموناس آئروژینوزا از لحاظ ساختمانی به پیلی موجود در نایسربا گونه آ شبیه است. گیرنده‌های غیرپیلوسی اغلب ترکیبات و اجزاء سطحی باکتری هستند که از این نوع ادهسین‌ها می‌توان به LPS اشاره کرد (۴۸،۵۲).

کپسول

سودوموناس آئروژینوزا یک کپسول پلی ساکاریدی تولید می‌کند که به نام‌های آگروپلی ساکارید موکوئیدی، پوشش آلژیناتی یا گلیکوکالیکس معروف است. این کپسول دارای چندین عملکرد می‌باشد. لایه پلی ساکاریدی سبب اتصال باکتری به سلول‌های پوششی و موسین نای و نایژه می‌شود.

می‌باشد. از جمله تب زایی، واکنش شوآتزمن، خاصیت کشندگی و غیره را نشان می‌دهد. لیپید A در سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با لیپید A در انتروباکتریاسه به طور غیر ارادی حاوی مقادیر زیادی فسفر است. شواهد زیر حاکی از این است که LPS نقش عمده‌ای در ویرولانسی باکتری ایفا می‌کند:

۱- آنتی بادی تولید شده بر ضد آن در مدل‌های تجربی مصنوعیت ایجاد می‌کند.

۲- موتانت‌های فاقد زنجیره‌های جانبی O در مقایسه با سویه وحشی خود غیر ویرولان هستند.

۳- LPS باعث محافظت سلول‌های باکتری در مقابل اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز می‌شود.

۴- باعث ایجاد مقاومت نسبت به عملکرد باکتریوساید کمپلمان در سرم انسانی طبیعی می‌گردد (۵۲).

این کپسول همچنین ارگانسیم را از فاگوسیتوز و فعالیت آنتی بیوتیک‌هایی همچون آمینوگلیکوزیدها محافظت می‌کند. تولید این پلی ساکارید موکوئیدی تحت تنظیم پیچیده‌ای قرار دارد. ژن‌های کنترل کننده تولید این ترکیب پلی ساکاریدی در بیمارانی (همچون مبتلایان به سیستمیک فیبروزیس یا دیگر بیماری‌های مزمن تنفسی) که نسبت به کلونیزه شدن دراز مدت با سویه‌های موکوئید سودوموناس آئروژینوزا مستعد و حساس می‌باشند، فعال می‌شوند. در زمان کشت آزمایشگاهی سویه‌های موکوئیدی توانایی بازگشت به حالت غیر موکوئیدی را دارند (۴۸).

اندوتوکسین

اندوتوکسین یا LPS در سودوموناس آئروژینوزا در بسیاری از خصوصیات مشابه سایر باکتری‌های گرم منفی

References

- 1- Motaghi B, Mojafipour S. Outer Membrane Protein D Gene in clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* and its Role in Antibiotic Resistance. *Journal of Fasa University of medical Sciences*, Winter 2016, vol 5, No.4.P 501-507.
- 2- Dosti M, Haj ojjagh Faghihi M, Ramazani A, Sainim. Comparison of convertional culture Methods and Polymerase chain Reaction (PCR) for specific Detection of *pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Isfahan Medcal school*, vol 30, No192, 2 nd week August 2012,p.780-786.
- ۳- ارزولو محسن، ستاری مرتضی، زواران حسینی احمد، فائزی سبحان. بررسی آثار حفاظتی آنتی بادی‌های ضد فلازلی سودوموناس آئروژینوزا بر عفونت سوختی ناشی از آن در موش‌های BALB/C. *مجله علوم پزشکی مدرسن: آسیب شناسی زیستی*، دوره ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۸، صص ۱۰-۱.
- ۴- اصلانی محمد مهدی، هاشمی پور مرجان، نیک بین وجیهه سادات، شاهچراغی فرشته، عیدی اکرم، شرفی زینب. شناسایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های تنفسی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) اختصاصی ژن‌های لیپوپروتئین غشای خارجی *oprI* و *oprL* و آگزوتوکسین A. یافته، دوره ۱۱، شماره ۲، تابستان ۸۸، مسلسل ۴۰، صص ۲۹-۲۳.
- 5- Aghaei S S, Javadi A, Sharifi Y, Morovvati A. Detection of Exotoxin A, Y, T, U, S genes of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Resistant to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Samples of Hospitalized Patients in Hospitals of Qom City, Iran. *Qom Univ Med Sci J.* 2016; 10 (1):48-55.
- 6- Buchanan, R.E. Gibbons, N.E. *Bergey's manual of determinative baccenology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp.141-219, 1974.
- 7- Collier, L., Balows, A. and Sussman, M. *Tapley and wilson's Microbiology and microbial infections*. 9th ed., oxford University press, Inc., New york, pp. 245-1138, 1998.
- 8- Clarke P.H. *Pseudomonas aeruginosa, an opportunist pathogen*. pp. 25-50 In: *Pseudomonas infection and alginates: Biochemistry, Genetics and Pathology*. Eds., Gacesa P, and Rassel N.J., Chapman and Hall, London, 1990.
- 9- Galli, E, Silver, S. and Witholt, B. *Pseudomonas, molecular biology and biotechnology*. Amer. Soci. for Microbiol, Washington D.C., pp. 1-40, 1992.



- 10- Hugh R, Gilardi, G.L. *Pseudomonas*. pp. 288-317. In: *Manual of clinical microbiology*. Eds., Lennette, E.H., Balows, A., Hausler W.J. and Truant, I.R, Amer. Soci. for Microbiol., Washington D.C., 1980.
- 11- Stanier, K.Y., Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. I *Gen. Microbiol.*, 43: 159-271, 1966.
- 12- Pallcroni, N.J. Genus. I. *Pseudomonas mogula*. pp. 141-199 In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.I. cds., Krieg, N.R Holt, J.G. Williams and Wilkins, Baltimore, 1984.
- 13- Palleroni, N.J. Present situation of the taxonomy of aerobic *Pseudomonas*. pp. 1-30. In: *Pseudomonas molecular biology and biotechnology*. eds., Galli, E, Silver, S. and Witholt, B., Amer. Soci. for Microbiol., Washington D.C., 1992.
- 14- Palleroni, N.J. Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M. Nuclid acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacterial*.
- 15- De Vos, P. and De Ley, J. Intra - and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrans. *Int. Syst. Bacterio!*, 33:487-509,1983.
- 16- Woese, CR., Blanz, P. and Hann, CM. What is'nt a *Pseudomonas*: The importance of nomenclature in bacterial classification. *Syst. Appl. Microbial*. 5: 179-195, 1984.
- 17- Poll c.L., Yap, EH., Tay, L. and Bergan, T. Plasmid prafiles compared with serotyping and pyocin typing for epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*. I. *Med. Microbia!*, 25: 109-114, 1988.
- 18- Lennette, E.H., Spaulding, E.H. and Tryant, J.P. *Manual of clinical Microbiology*. 2 th ed, Amer Soci for Microbiol Washington DC 1974 , pp.252-300.
- 19- O'Leary, W.M. *Practical handbook of microbiology*. CRC Press, Boca Raton, Florida Inc., pp. 55-66,1989.
- 20- Pallcroni, N.J. Genus. I. *Pseudomonas mogula*. 1984, pp. 141-199 In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.I. cds., Krieg, N.R Holt, J.G. Williams and Wikins , Baltimore.
- 21- Doggett, R.G. *Microbiology of Pseudomonas aeruginosa*. Academic Press, New York, pp. 1-20, 1979.
- 22- Collier L. Balows A. and Sussman M. *Topley and Wison's microbiology and microbial infections*. 4th ed., Oxford University Press, Inc. ,New York1998; pp: 245-1138.
- 23- Brooks G.F. Butel J.S. and Morse S.A. *Jawets Melnick and Adelberg's Medical Microbiology, Lange Basic Science*. 2004; pp:262-267.
- 24- Guerin-mechin L. Leveau JY. Dubois - Brissonnet F. Resistance of spheroplasts and whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal activity of various biocides: evidence of the membrane implication. *Microbiol Res*. 2004;159(1):51-57.
- 25- Meadow P.M. Wall and membrane structure in the genus *Pseudomonas*. Wiely, Chichester. 1975; pp:67-98.
- 26- Ma Q. Zhai Y. Schneider J.C. Ramseier T.M. Saier MH Jr. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P.fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003;1611(1-2):223-233.
- 27- Johnson J.M. Churck G.M. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J. Mol. Biol*. 1999;287(3):695-715.
- 28- Nikaido H. and Hancock R.E.W. Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *The biology of Pseudomonas*. Ed. Sokateh J.R., Academic Press. 1986;pp:145-193.
- 29- Brennan FR. Jones T.D. Gilleland L.B. Bellaby T. Xu F., North P.C. Thompson A. Staczek J. Lin T. Johnson J.E. Hamilton W.D. Gilleland HE Jr. *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virois. *Microbiology*1999 Jan;145(Pt 1):211-220.
- 30- Hancock R.E. Wong R. Potential of protein OprF of *Pseudomonas* in bivalent vaccines. *Behring Inst Mitt*. 1997 Feb;(98):283-90.
- 31- Thomas L.D. Kyd J.M. Bastin D.A. Dunkley M.L. Cripps A.W. Immunisation with non-integral OMPs promotes pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS .Immunol. Med .Microbiol*. 2003 Jul 15; 37(2-3):155-160.
- 32- Murate T. Gotoh N. Nishino T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas*

- aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. *FEMS.Microbiol. Lett.* 2002 Nov 19;217(1):57-63.
- 33- Arora S.K. Wolfgang M.C. Lory S. Ramohal R. Sequence polymorphism in the glycosylation island and flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2004 Apr;186(7):2115-2122.
- 34- Morgan J.A. Bellingham N.F. Winstanley C. Ousley M.A. Hart C.A. Saunders J.R. Comparison of flagellin genes from clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999 Mar;65(3):1175-1179.
- 35- Spangenberg C. Heuer T. Burger C. Tumbler B. Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 1996 Nov 4;396(2-3):213-217.
- 36- Winstanley C. Coulson M.A. Wepner B. Morgan J.A. Hart C.A. Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 1996 Aug; 142 (Pt8):2145- 2151.
- 37- Huang B. Ru K. Yuan Z. Whitchurk C.B. Mattick J.S. TonB3 is required for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *J. Bacteriol.* 2004 Jul;186(13):4387-4389.
- 38- Alm R.A. Mattick J.S. Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 1990 Jun 11;192(1): 89-98.
- 39- Waston A.A. Alm R.A. Mattick J.S. Identification of a gene, *pilF*, required for type 4 fimbrial biogenesis and twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 1996 Nov 21; 180(1-2):49-56.
- 40- Van Schaik E.J. Giltner C.L. Audette G.F. Keizer D.W. Bautista D.L. Slupsky C.M. Sykes B.D. Irvin R.T. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J. Bacteriol.* 2005 Feb; 187(4): 1455-1464.
- 41- Muller M. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic. Biol. Med.* 2002 Dec 1;(11):1527-1533.
- 42- Lau G.W. Hassett D.J. Ran H. Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends. Mol. Med.* 2004 Dec ;10(12): 599-606.
- 43- Gaceca P. and Russel N.J. *Pseudomonas* infection and alginate, Chapman and Hall, London. 1999;pp:1-25.
- 44- Murray P. Rosenthal K. Kobayashi G. and Pfaller M. *Medical Microbiology*, 8th ed. Amer. Soci. For Microbiol., USA. 2003;pp:719-728.
- 45- Lory S. and tai P.C. Biochemical and genetic aspects of *Pseudomonas aeruginosa*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1985;118:53-89.
- 46- Anderjko M. Cytrynska M. Jakubwicz T. Apolipoprotein III is a substrate for protease IV from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005 Feb 15;243(2):331-337.
- 47- Gupta A. Roy I. Khare S.K. Gupta M.N. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *J. Chromatogr. A.* 2005 Apr 1;1069(2):155-161.
- 48- Murray R.G.E. Holt J.G. Krieg N.R. and Sneath P.H.A. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore. 2001;pp:141-219.
- 49- Kline T. Formhold M. McKennon T.E. Cai S. Treiberg J. Ihle N. Sherman D. Schwan W. Hickey M.J. Warren P. Witte P. Brody L.L. Goltry L. Barker L.M. Anderson S.U. Tanaka S.K. Shawer R.M. Nguyen L.Y. Langhorne M. Bigelow A. Embuscado L. Antimicrobial effects of novel siderophores linked to beta-lactam antibiotics. *Bioorg. Med. Chem.* 2000 Jan;8(1):73-93.
- 50- Xiong G. Struckmerier M. Lutz F. Pore-forming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin. *Toxicology.* 1994 Feb 28;87(1-3):69-83.
- 51- Barbieri J.T. Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT. *Rev. Physiol. Biochem pharmacol.* 2004;152:79-92.
- 52- Abigail A. and Dixie D. *Bacterial pathogenesis*. 2th ed. Amer. Soci. For Microbiol., Washington D.C. 2002;pp: 247-261.

