Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

Original Article

Detection of Phenazine Genes in Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Farnaz Tutunchi[1], Habib Zeighami[2*]

1- M.Sc. Student, Department of Microbiology, Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 4513956111, Department of Microbiology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran*
Email: zeighami@zums.ac.ir

Received: 14/Jan/2016, Accepted: 09/May/2016

Abstract

Objective: *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* is an opportunistic pathogen with numerous virulence factors considered to be one of the most etiological agents in nosocomial infections. The emergence of multi-drug resistant (MDR) *P. aeruginosa* has become a serious, worldwide public health threat. This study intended to determine the frequency of *phzM, phzS, phzH, phzI,* and *phzII* genes in MDR *P. aeruginosa* strains isolated from clinical samples.

Methods: In this cross-sectional study, we examined 93 isolates of *P. aeruginosa* collected from different clinical samples in Zanjan during 1393-94. After identification of isolates by biochemical tests, we performed the antibiotic susceptibility test (Kirby-Bauer) per CLSI guidelines. Then, total DNA was extracted for PCR analysis to detect *phzM, phzS, phzH, phzI,* and *phzII* genes.

Results: *P. aeruginosa* isolates exhibited high-level resistance to Erythromycin and Cefoxitin (95.6%). Amikacin showed the highest activity against isolates with 73.2% susceptibility. There were 88 (94.6%) MDR isolates. The genes had the following frequency among MDR isolates: *phzI* (96.5%), *phzII* (93.1%), *phzM* (45.4%), *phzS* (27.2%), and *phzH* (27.2%).

Conclusion: The pathogenesis of *P. aeruginosa* is clearly multifactorial as shown by the large numbers of virulence factors and the broad spectrum of diseases this bacterium causes. The results indicated a greater frequency of *phzI* and *phzII* genes in MDR *P. aeruginosa* strains. This finding could be an alarm for the infections caused by this microorganism.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Multidrug resistant, Phenazine

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.1, Pages: 1-11

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

مقاله اصیل

شناسایی ژن‌های مولد فنازین در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزای با مقاومت چند دارویی

فرناز توتونچی[1]، حبیب ضیغمی[2*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۲- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، زنجان، کدپستی: ۴۵۱۳۹۵۶۱۱۱، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، گروه میکروب‌شناسی
Email: zeighami@zums.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۴/۱۰/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۵/۰۲/۰۲

چکیده

هدف: سودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت‌طلب با عوامل بیماری‌زایی متعدد و از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است. ظهور مقاومت‌های چند دارویی در این باکتری از عوامل تهدید کننده حیات محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی و تعیین فراوانی ژن‌های مولد فنازین (*phzI*، *phzII*، *phzM*، *phzS*، *phzH*) در بین جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزای با مقاومت چند دارویی جدا شده از نمونه‌های بالینی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی مقطعی ۹۳ جدایه از نمونه‌های بالینی مختلف از بیمارستان‌های شهر زنجان طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تعیین هویت و آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش کربی-باثر و طبق توصیه CLSI انجام شد. DNA جدایه‌ها به روش جوشاندن استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای هرکدام از ژن‌های *phzI*، *phzII*، *phzM*، *phzS*، *phzH* حضور یا عدم حضور ژن‌های مربوطه با PCR بررسی شد.

نتایج: در بین ۹۳ جدایه بیشترین درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به اریترومایسین و سفوکسیتین (۹۵/۶ درصد) و بیشترین درصد حساسیت مربوط به آمیکاسین (۷۳/۲ درصد) بود. همچنین ۸۸ جدایه (۹۴/۶ درصد) نسبت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی یا تعداد بیشتری مقاوم بودند و به‌عنوان جدایه‌هایی با مقاومت چند دارویی در نظر گرفته شدند. ۸۵ جدایه (۹۶/۵درصد) حامل ژن *phzI*، ۸۲ جدایه (۹۳/۱درصد) حامل ژن *phzII*، ۴۰ جدایه (۴۵/۴ درصد) حامل ژن *phzM*، ۲۴ جدایه (۲۷/۲ درصد) حامل ژن‌های *phzS* و *phzH* بودند.

نتیجه‌گیری: بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا به‌دلیل تولید عوامل بیماری‌زایی متعدد این باکتری است که در نهایت منجر به طیف وسیعی از عفونت‌ها می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد فراوانی ژن‌های *phzI* و *phzII* در بین سویه‌های با مقاومت چند دارویی به‌دست آمده از منابع مختلف بالاست که می‌تواند هشداری برای عفونت‌های حاصل از این باکتری باشد.

کلیدواژگان: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فنازین

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحات: ۱-۱۱

مقدمه

سودوموناس (*Pseudomonas*) ارگانیسمی گرم منفی و هوازی است که مهم‌ترین گونهٔ بیماری‌زای آن در انسان، سودوموناس

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) است. بعد از اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) سومین بیماری‌زای فرصت‌طلب بیمارستانی شناخته شده [۱] و عامل عفونت‌های خطرناک خونی، ریوی، زخم و سوختگی به‌خصوص در افراد با نقص ایمنی است [۲]. این تنوع در عفونت‌های سودوموناسی به‌دلیل گسترش ساز و کارهای مختلف اکتسابی از جمله تنظیم بیان ژن است. به‌علاوه با تشکیل بیوفیلم توانایی محافظت در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضدمیکروبی مختلف را ایجاد می‌کند [۳]. با مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های مقاوم به چند دارو (Multi Drug Resistance: MDR) در سراسر جهان به‌طور فزآینده‌ای افزایش یافته است [٤]. در صورت درمان سریع احتمال بهبودی عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد، ولی هیچ آنتی‌بیوتیکی قادر به ریشه‌کنی عفونت‌های مزمن آن نیست [٥]. افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشکلات زیادی در درمان بیماران ایجاد نموده و موجب افزایش مرگ و میر شده است [٦]. مقاومت دارویی سودوموناس آئروژینوزا به‌دلیل ساز و کارهای مختلفی مانند، تولید آنزیم‌های سفالوسپورینیاز (Cephalosporinase) (به‌دلیل وجود ژن AmpC)، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز (Beta-lactamase)، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی (کاهش پروتئین OprD، سنتز آنزیم‌هایی مانند فسفریل ترانسفرازها و استیل ترانسفرازها (باعث مقاومت به آمینوگلیکوزیدها) و همچنین تغییر در توپوایزومراز II و IV [مقاومت به کینولون‌ها (Quinolone)] ایجاد می شود [۷، ۸]. علاوه بر آنزیم‌های ذکر شده ساز و کار دیگری در مقاومت آنتی‌بیوتیکی تحت عنوان افلوکس پمپ (Efflux pump) وجود دارد [۹]. بنابراین مقاومت بالای این باکتری در برابر مواد ضدمیکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها باعث پیچیده‌تر شدن درمان عفونت های ناشی از این باکتری و تبدیل آن به یکی از معضلات بزرگ پزشکی شده است [۱۰]. به نظر می‌رسد که قدرت بقای باکتری در محیط اطراف و انتقال آن به بیماران توسط عوامل مختلف، مهم‌ترین عامل شیوع این عفونت‌ها در بیمارستان‌ها است [۱۱]. سودوموناس آئروژینوزا برای ایجاد عفونت از عوامل بیماری زایی داخل سلولی و ترشحی استفاده می‌کند که شامل فلاژل (Felagellum)، لیپو پلی ساکارید، فنازین ها (Phenazine)، پروتئازها، فسفولیپاز و رامنولیپید (Rhamnolipid) است [۱۲]. فنازین‌ها، ترکیبات هتروسیکلیک حاوی نیتروژن است که توسط چندین گونه باکتریایی تولید می‌شود. بیشترین فنازین توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شود که به‌دلیل خواص ضد میکروبی و نقش آن‌ها در بیماری‌زایی به شدت مورد مطالعه قرار گرفته‌است [۱۳]. کشف آن‌ها به اواخر قرن ۱۹ بر می‌گردد، زمانی که پزشکان متوجه چرک آبی رنگی شدند که از زخم های چرکی بیماران ترشح می شد [١٤]. آن‌ها منبعی برای متابولیت‌هایی مانند آمینواسیدهای آروماتیک، سیدروفورها (Siderophores) و کوئینین‌ها (Quinone) هستند. از دیدگاه بیوتکنولوژی، اهمیت فنازین‌ها مربوط به خواص فیزیکوشیمیایی آن‌ها می‌شود که شامل خواص اکسیداسیون و کاهش رنگدانه‌های درخشان آن‌ها و توانایی تغییر رنگ با وضعیت pH و اکسیداتیو است. فنازین ها فشار اکسیداتیو داخل سلولی را به واسطه چرخه اکسایش و کاهش، افزایش داده، سوپر اکسید تولید می‌کند [۱۵]. این ترکیبات می تواند فعالیت میتوکندری، تکثیر سلولی، ترشح سایتوکاین و تولید دیسموتاز در نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها را مهار کند [١٦]. همچنین فنازین‌ها برای بسیاری از اعمال مختلف، از جمله به عنوان دهنده و گیرنده الکترون، گیرنده‌های زیست محیطی و حسگرهای زیستی و به عنوان اجزای مرکزی ترکیبات ضد تومور استفاده می‌شود. دو اپرون همولوگ با نام‌های *phzA1B1C1D1G1* (*phzA1*) و *phzA2B2C2D2G2* (*phzA2*)، سنتز ترکیبات فنازین را به عهده دارند. *phzA1* برای تولید اکثر فنازین‌ها بیان می‌شود. علاوه بر این؛ تولید ژن‌های *phzM*، *phzH* و *phzS* برای تبدیل ۱-فنازین کربوکسیلیک اسید به سایر محصولات نهایی از جمله فنازین ۱-کربوکسامیدی، ۱-هیدروکسی فنازین و پیوسیانین

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

(Pyocyanin) مورد نیاز است [۱۵]. فنازین‌ها به‌عنوان عوامل بیماری‌زا به تشکیل بیوفیلم کمک کرده و بـه‌عنـوان پیـام‌هـای سلول عمل می کند که الگوهای بیان ژن را تنظیم می‌کنـد. در میزبان یوکاریوتی و بافت‌های میزبان، پاسخ‌های سلولی میزبان را تغییر می‌دهد. افزایش غلظت فنازین در ریه، مانند عفونت مزمن در یک بیمار سیستیک فیبروزیس (Cystic fibrosis)، می‌تواند عملکرد سلول اپی‌تلیال را مختل کند و پاسخ ایمنی را کاهش دهد [۱۷]. در مطالعهٔ حاضر با توجه به اهمیت فنازین‌ها در فرآیند بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا، فراوانی ژن‌های فنـازین (*phzH* ،*phzS* ،*phzM* ،*phzII* ،*phzI*) در جدایه‌های بالینی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این جدایه‌ها بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعهٔ توصیفی مقطعی، ۹۳ جدایه از نمونـه‌هـای بالینی مختلف شامل ادرار، خون، ترشحات تنفسی، مـدفوع و زخم طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ از سه بیمارسـتان شـهر زنجـان جداسازی شد (نمونه های مورد بررسی طبق مصـوبه شـماره ۱۳۸۳۰۵۰۷۹۳۲۰۱۴ در دسـترس قـرار گرفـت). بـرای تأییـد جدایه‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی مرسوم اسـتفاده شـد [۱۸]. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشـار دیسـک (Disk diffusion) [کربی-بائر (Kirby-bauer)] طبق توصـیه CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) انجام شد [۱۹]. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده محصول شـرکت MAST انگلستان و بـه شـرح زیـر بودنـد: آموکسـی‌سـیلین (Amoxicillin) (۲۵ میکروگرم)، آمیکاسین (Amikacin) (۳۰ میکروگـرم)، آزتریونـام (Aztreonam) (۳۰ میکروگـرم)، اریترومایسـین (Erythromycin) (۱۵ میکروگـرم)، ایمـی‌پـنم (Imipenem) (۱۰ میکروگرم)، تتراسیکین (Tetracycline) (۳۰ میکروگـرم)، جنتامیسـین (Gentamicin) (۱۰ میکروگـرم)، سفوکسـیتین (Cefoxitin) (۳۰ میکروگـرم)، سـفتازیدیم (Ceftazidime) (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (Cefotaxime) (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) (۵ میکروگرم)، کوآموکسـی کـلاو (co Amoxiclav) (۳۰ میکروگـرم)، کوتریموکسازول (Cotrimoxazole) (۲۵ میکروگرم). پـس از انجام انتشار دیسک، قطر هالهٔ عدم رشد در اطراف هر دیسک انـدازه‌گیـری و نتـایج آن بـا توجـه بـه اسـتانداردهای CLSI بـه‌صـورت حسـاس، مقـاوم و بینـابینی گـزارش شـد. سـویه سـودوموناس آئروژینـوزای $ATCC_{10145}$ بـه‌عنـوان سـویه استاندارد برای کنتـرل آنتـی‌بیـوگرام اسـتفاده شـد. بـه‌منظـور شناسـایی ژن‌هـای فنـازین (*phzI*، *phzII*، *phzM*، *phzS*، *phzH*) ابتـدا DNAی تـام جدایـه‌هـا بـا اسـتفاده از روش جوشاندن استخراج شد. به‌طوری که ابتدا یـک سوسپانسـیون نسبتاً غلیظ از باکتری تهیه شد و بعـد از ورتکـس (Vortex)، سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از اضافه کردن بافر TE (Tris EDTA) و سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و سپس بلافاصله روی یخ به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. در مرحله آخر با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه سـانتریفوژ و محلول رویی حاوی DNA استخراجی بـه میکروتیـوب‌هـای استریل منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگرهای (Primers) اختصاصی برای هر ژن انجام شـد (جـدول ۱) [۲۰]. بـه ایـن صورت که ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شـد، ۱ میکرولیتـر آغازگر ۱۰ پیکومول از هر آغازگر و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر به ۱۲/۵ میکرولیتر مخلـوط اصـلی PCR (PCR Mastermix) (Fermentas، آمریکا) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه شد. از سودوموناس آئروژینوزای PAO1 بـه‌عنـوان کنتـرل مثبـت استفاده شد. ژن‌های مذکور طبـق برنامـه جـدول ۲ بـه روش PCR تکثیر شد. لازم بـه ذکـر اسـت بـرای ژن‌هـای *phzH* و *phzII* به‌علت هم‌دمـا بـودن، PCR مضـاعف (duplex PCR) صورت گرفت. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل ۱/۵ درصد آگارز انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) نتایج با ماورای بنفش مشاهده شد. از نشانگر ۱۰۰

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

جفت باز (Fermentas، آمریکا) بـرای تأییـد وزن مولکـولی محصولات تکثیر شده استفاده شد.

جدول ۱ آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های فنازین

آغازگر	توالی آغازگرها (۳'-۵')	اندازه (جفت باز)	مرجع
phzII	F:GCCAAGGTTTGTTGTCGG R:CGCATTGACGATATGGAAC	۱۰۳۶	۱۷
phzM	F:ATGGAGAGCGGGATCGACA R:ATGCGGGTTTCCATCGGCAG	۸۷۵	
phzS	F:TCGCCATGACCGATACGCTC R:ACAACCTGAGCCAGCCTTCC	۱۷۵۲	
phzI	F:CATCAGCTTAGCAATCC R:CGGAGAAACTTTTCCCTC	۳۹۲	
phzH	F:GGGTTGGGTGGATTACAC R:CTCACCTGGGTGTTGAAG	۱۷۵۲	

جدول ۲ برنامه چرخه‌های PCR برای شناسایی ژن‌های مورد بررسی

برنامه	نوع عملیات	دما (درجه سانتی‌گراد)		زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
۱	واسرشتگی اولیه	۹٤		۵	۱
	واسرشتگی	۹٤		۱	۳۰
۲	اتصال	*phzM*	۵٤	۱	
		phzS	٦۳		
		phzH	۵۱		
		phzI	٤۹		
		phzII	۵۱		
۳	طویل شدن	۷۲		۱	۱
٤	طویل شدن نهایی	۷۲		۱۰	۱

نتایج

از ۹۳ جدایه سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از نمونه های بالینی ۳۱ جدایه (۳۳ درصد) مربوط به نمونه‌هـای ادرار، ۲٦ جدایه (۲۸ درصد) مربوط به نمونه‌هـای خـون، ۱۷ جدایه (۱۸ درصد) مربوط به نمونه‌های تنفسی، ۱۰ جدایه (۱۱ درصد) مربوط به نمونه‌های خلط، ۸ جدایه (۹ درصد) مربوط به نمونه‌های مدفوع و ۱ جدایه (۱ درصد) مربوط به نمونه‌های زخم بود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشـترین درصـد مقاومت مربوط به اریترومایسین (۹۵/٦ درصد) و سفوکسـیتین (۹۵/٦ درصد) و کمترین درصد مقاومت مربوط به آمیکاسـین (۲٦/۸ درصد) بود. بررسی این الگوی مقاومت آنتـی‌بیـوتیکی، میزان بالای مقاومت سویه های جدا شده را در مـورد اکثریـت آنتـی‌بیوتیـک‌هـا نشـان داد. نتـایج حساسـیت آنتـی‌بیـوتیکی جدایه های سودوموناس آئروژینوزا به‌صورت مقاوم، بینابینی و حساس برای هر آنتی‌بیوتیک به روش انتشار دیسک، در جدول ۳ گزارش شده است. جدایه‌ها بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در برابر بتالاکتام ها و بیشترین حساسـیت آنتـی بیـوتیکی را در برابر فلوروکینولون‌ها (Fluoroquinolones) بـه میـزان ۵۰/۵

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

درصد نشان دادند. همچنین از ۹۳ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، ۸۸ جدایه (۹٤/٦درصد) به بیش از سه خانواده از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مقاوم بودند و به‌عنوان جدایه‌هایی با مقاومت چند دارویی در نظر گرفته شدند. از این میان، ١٤ جدایه نسبت به ۳ کلاس از آنتی بیوتیک های مصرفی مقاوم و MDR سه‌تایی در نظرگرفته شدند و ۲۷ جدایه نسبت به ٦ خانواده آنتی بیوتیکی مقاومت نشان دادند و جز MDR شش‌تایی قرار گرفتند (جدول ٤).

نتایج PCR نشان داد از ۹۳ جدایه، ٤۲ جدایه (٤٥/١ درصد) حامل ژن *phzM*، ۹۰ جدایه (۹٦/۷درصد) حامل ژن *phzI*، ۲٦ جدایه (۲۷/۹درصد) حامل ژن *phzH*، ۸٤ جدایه (۹۰/۳ درصد) حامل ژن *phzII* و ۲٦ جدایه (۲۷/۹ درصد) حامل ژن *phzS* بودند (جدول ٥). لازم به‌ذکر است تنها ۱ نمونه ادرار شامل همهٔ ژن های مورد بررسی بود، اما به طور همزمان ۱۸ جدایه (۱۹/۳درصد) حامل ٤ ژن و ٤۸ جدایه (٥۱/٥ درصد) حامل ۳ ژن بودند.

جدول ۳ نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد بررسی

کل نمونه: ۹۳			
آنتی‌بیوتیک	**مقاوم، تعداد (درصد)**	**بینابینی تعداد (درصد)**	**حساس تعداد (درصد)**
آزترونام	۳۹ (۹٤/۱)	۱۷ (۱۸/۲)	۳۷ (۳۹/۷)
سفوکسیتین	۸۹ (۹٥/٦)	–	٤ (٤/۳)
ایمی‌پنم	۳۱ (۳۳/۳)	–	٦۲ (٦/٦٦)
آموکسی‌سیلین	۸٥ (۹۱/۳)	۳ (۳/۲)	٥ (٥/۳)
سفتازیدیم	۳۱ (۳۳/۳)	٥ (٥/۳)	٥۷ (٦۱/۲)
سفوتاکسیم	٤۷ (٥۰/٥)	۱۰ (۱۰/۷)	۳٦ (۳۸/۷)
کوآموکسی کلاو	۸۳(۸۹/۲)	۱ (۱)	۹ (۹/٦)
تتراسایکلین	۳۲(۳٤/٤)	۲۱ (۲۲/٥)	٤۰ (٤۳)
کوتریموکسازول	۷۲(۷۷/٤)	٦ (٦/٤)	۱٥ (۱٦/۱)
آمیکاسین	۲٥ (۲٦/۸)	٦ (٦/٤)	٦۲ (٦٦/٦)
جنتامیسین	٦٤ (٦۸/۸)	۱ (۱)	۲۸ (۳۰/۱)
سیپروفلوکساسین	۳۷ (۳۹/۷)	۹ (۹/٦)	٤۷ (٥۰/٥)
اریترومایسین	۸۹ (۹٥/٦)	–	٤ (٤/۳)

جدول ٤ بررسی انواع الگوهای MDR در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده

منابع جدایه‌ها	**تعداد نمونه‌ها**	**تعداد MDR**	**انواع الگوهای MDR**			
			سه تایی	**چهار تایی**	**پنج تایی**	**شش تایی**
ادرار	۳۱	۲۹	٤	٦	۸	۱۱
خون	۲٦	۲٤	٤	٥	۹	٦
تنفسی	۱۷	۱٦	٤	٤	۲	٦
خلط	۱۰	۱۰	۱	۳	٤	۲
مدفوع	۸	۸	۱	۳	۲	۲
زخم	۱	۱	–	–	۱	–
کل :	۹۳	۸۸	۱٤	۲۱	۲٦	۲۷

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

جدول ۵ فراوانی ژن‌های فنازین مورد بررسی در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا

ژن‌های فنازین	تعداد کل جدایه‌ها= ۹۳	MDR= ۸۸	NON MDR= ۵
	تعداد نمونه (درصد)	تعداد MDR (درصد)	تعداد NON MDR (درصد)
phzM	۴۲ (۴۵/۱)	۴۰ (۴۵/۴)	۲ (۴۰)
phzH	۲۶ (۲۷/۹)	۲۴ (۲۷/۲)	۲ (۴۰)
phzS	۲۶ (۲۷/۹)	۲۴ (۲۷/۲)	۲ (۴۰)
phzI	۹۰ (۹۶/۷)	۸۵ (۹۶/۵)	۵ (۱۰۰)
phzII	۸۴ (۹۰/۳)	۸۲ (۹۳/۱)	۲ (۴۰)

میزان فراوانی ژن‌های *phzI*، *phzII*، *phzM*، *phzS*، *phzH* در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چند دارویی به‌ترتیب ۸۵ (۹۶/۵ درصد)، ۸۲ (۹۳/۱ درصد)، ۴۰ (۴۵/۴ درصد)، ۲۴ (۲۷/۲ درصد)، ۲۴ (۲۷/۲ درصد) به‌دست آمد (جدول ۵) لازم به‌ذکر است بین الگوهای مختلف MDR، بیشترین فراوانی را ژن‌های *phzI* ۲۴ (۲۷/۲درصد) و *phzII* ۲۶ (۲۹/۵ درصد) در MDR ۶تایی به خود اختصاص دادند.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل فرصت‌طلب و جدی در عفونت‌های بیمارستانی است که در بیماران دچار نقص در سیستم ایمنی، نوتروپنی (Neutropenia)، سوختگی و دریافت‌کنندگان پیوند، ایجاد بیماری‌های جدی و مخرب می‌کند [۲۱]. به‌علت بیماری‌زایی بالا و نقش برجسته آن در بیماری‌زایی انسان به خوبی مطالعه شده است. همچنین این ارگانیسم می‌تواند روی جانوران و گیاهان تأثیر بگذارد و در بسیاری از شرایط زیست محیطی، از جمله در خاک و آب رشد کند [۲۲]. افزایش شیوع عفونت‌های ناشی از مقاومت چند دارویی با مرگ و میر و اختلالات و عوارض قابل توجهی همراه است؛ زیرا درمان جایگزین برای این قبیل عفونت‌ها وجود ندارد. در واقع ریشه‌کنی سودوموناس آئروژینوزا به‌دلیل دارا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌های متداول مشکل است [۲۳، ۲۴]. گفته‌شده، مقاومت به عوامل ضد میکروبی تهدیدی جدی برای سلامت عمومی است. به‌طوری که گزینه‌های درمان را محدود می‌کند و منجر به افزایش مرگ و میر می‌شود. با توجه به افزایش میزان مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا، انتظار می‌رود مقاومت چند دارویی می‌تواند در بسیاری از بیمارستان‌ها گسترش یابد. در بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا چندین فاکتور بیماری‌زا مانند ترکیبات ساختاری، توکسین‌ها و آنزیم‌ها دخالت دارد. از این میان مشخص شده سودوموناس‌ها فنازین‌های مختلفی تولید می‌کنند [۲۵] که مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در سودوموناس آئروژینوزا به‌حساب می‌آید [۲۶]. همچنین به‌عنوان مولکول‌های پیام رسان سلول به سلول عمل می‌کند و علیه باکتری‌های دیگر فعالیت مهارکنندگی دارد [۲۷]. این سمیت فنازین‌ها به‌دلیل فعالیت اکسایش-کاهش (Oxidation-reduction: redox) ذاتی آن‌ها است. مطالعات انجام شده در مدل عفونت‌های حیوانی و گیاهی نیز نقش بیماری‌زای فنازین‌ها را مشخص کرده‌است [۲۸]. در مطالعهٔ اخیر عوامل بیماریزای فنازین که نقش مهمی در بیماری‌زایی و پایداری عفونت ناشی از سودوموناس آئروژینوزا دارد، بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد جدایه‌ها بیشترین مقاومت را به اریترومایسین و سفوکسیتین ۸۹ (۹۵/۶ درصد) و کمترین درصد مقاومت را به آمیکاسین ۲۵ (۲۶/۸ درصد) نشان دادند. همچنین درصد مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نسبتاً بالا بود. از ۹۳ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، ۸۸ جدایه جدایه هایی با مقاومت چنددارویی (MDR) شناخته شدند. در نتیجه ۹۴/۶ درصد از جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی چند مقاومتی بودند. از این میان

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

بالاترین میزان فراوانی را در جدایه‌ها، ژن‌های *phzI* (۹۶/۵ درصد) و *phzII* (۹۳/۱ درصد) به خود اختصاص دادند. قابل توجه است که فراوانی ژن *phzI* ۲٤ (۲۷/۲ درصد) و *phzII* ۲٦ (۲۹/۵ درصد) در ٦ MDR تایی در مقایسه با جدایه‌های دارای ژن‌های *phzM*، *phzS* و *phzH* بیشتر بود. لازم به‌ذکر است تنها ۱ نمونه ادرار شامل همهٔ ژن‌های مورد بررسی بود، اما به‌طور همزمان ۱۸ جدایه (۱۹/۳درصد) حامل ٤ ژن، ٤۸ جدایه (۵۱/۵ درصد) حامل ۳ ژن بودند. همچنین بیشترین فراوانی جدایه‌ها در نمونه‌های ادرار (۳۳ درصد) و کمترین فراوانی در نمونه‌های زخم (۱ درصد) مشاهده شد.

در سال‌های ۲۰۱۰–۲۰۱۱ مطالعه‌ای توسط Sana Jamali و همکارانش در شمال هند روی ۷۳ جدایه انجام گرفت که نتایج حاصل از حساسیت آنتی‌بیوتیکی را بدین ترتیب گزارش کردند: سفوکسیتین ۹۱/۸ درصد، آمیکاسین ۷۲/۲ درصد و جنتامیسین ٦۸/۵ درصد. می‌توان گفت میزان مقاومت جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به سفوکسیتین و جنتامیسین با مطالعه حاضر مشابه است، اما در مورد آمیکاسین اختلاف زیادی وجود دارد که می‌تواند مربوط به زمان و شرایط مطالعه یا به‌دلیل مصرف زیاد این آنتی‌بیوتیک در شمال هند باشد [۲۹]. مطالعه‌ای نیز در سال ۲۰۱۲ در گیلان توسط نیکوکار و همکاران انجام پذیرفت و مقاومت به ایمی‌پنم ۲۳/۳ درصد، آمیکاسین ٤۸/۸ درصد، جنتامیسین ۳۷/۲ درصد و سیپروفلوکساسین ٦۳/۳ درصد گزارش شد که تنها میزان مقاومت به ایمی‌پنم (۳۳/۳ درصد) با مطالعه حاضر مطابقت دارد [۲۹]. در مطالعه ایمانی و همکارانش در سال ۲۰۰۹، بیشترین مقاومت جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا را به کوتریموکسازول و آموکسی‌سیلین به‌ترتیب ۹٦/٤ درصد و ۹۲/۷ درصد و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، جنتامیسین و آمیکاسین را به‌ترتیب ۲۵/۵ درصد، ۲۰/۹ درصد، ۲۵/۵ درصد، ۱۷/۳ درصد گزارش کردند که مقادیر آموکسی‌سیلین، آمیکاسین و سفتازیدیم با نتایج بررسی حاضر تا حدودی مطابقت دارد و میزان مقاومت در مورد سایر آنتی‌بیوتیک‌های فوق در مطالعه حاضر افزایش یافته است [۳۰].

فینان (Finnan) و همکارانش در سال ۲۰۰٤ در بروکسل و ایرلند با جداسازی ۱۲ جدایه از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، فراوانی ژن‌های *phzM* (۹۱/٦ درصد)، *phzII* (۱۰۰ درصد)، *phzH* (۱۰۰ درصد)، *phzS* و *phzI* (۸/۳ درصد) گزارش کردند که فراوانی *phzII* با مطالعه حاضر مطابقت دارد [۲۰]. در مطالعه دادمنش و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای در خصوص عفونت ادراری کودکان در بیمارستان بقیهٔ الله تهران روی ۲۳ جدایه با مقاومت چند دارویی، میزان فراوانی ژن‌های فنازین *phzI* (۳۰/٤ درصد)، *phzH* (۱۳/٤ درصد)، *phzII* (۲٦ درصد)، *phzM* (٤۳/٤ درصد) و *phzS* (۲۵/۵ درصد) گزارش شده است که میزان فراوانی *phzM* با نتیجه مطالعه مطابقت دارد [۳۱]. در دو مطالعه ذکر شده بالا اختلاف در میزان فراوانی ژن‌ها می‌تواند به‌علت مطالعه روی یک نمونه خاص باشد. در سال ۲۰۱٤ فاضلی و همکارانش در رابطه با عفونت‌های بالینی بیمارستان بقیهٔ الله تهران روی ۱۰۲ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، میزان فراوانی ژن‌های فنازین را این گونه گزارش کردند: *phzI* (۱۱/۷ درصد)، *phzH* (۲۰/۵ درصد)، *phzII* (۲۸/٤ درصد)، *phzM* (۳٦/۲ درصد) و *phzS* (۱۹/٦ درصد) [۳۲]. میزان فراوانی ژن‌های *phzM*، *phzS* و *phzH* تا حدودی با مطالعه حاضر همسو است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به سرعت در حال افزایش است، اما هنوز مطالعات دقیقی مبنی بر فراوانی ژن‌های فنازین و ارتباط آن‌ها با مقاومت چند دارویی سودوموناس آئروژینوزا صورت نگرفته است. چرا که عوامل بیماری‌زایی متعددی در ایجاد عفونت‌های سودوموناسی نیز نقش دارد و ممکن است در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی مؤثر باشد. به‌طور کلی با توجه به مطالعات ذکر شده می توان نتیجه گرفت، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای پیشرفته در مقایسه با کشور ما، ایران، و شهر زنجان پایین‌تر بوده و احتمالاً به‌دلیل مصرف کنترل‌شدهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها است. میزان بالای عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا با

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

مقاومت چند دارویی در بیمارستان‌های کشور نگران‌کننده است و آگاهی، نظارت مستمر و انتخاب درست آنتی بیوتیک بـرای کنترل و جلوگیری از گسترش گونه‌های مقاوم ضروری است. همچنین با توجه به تحقیقاتی که در رابطه با فراوانی فنازین‌ها و ارتباط بین این ژن‌هـا بـا مقاومـت چنـد دارویـی صـورت گرفته‌است، می‌توان نتیجه گرفت ژن‌هـای فنـازین بـه عنـوان عوامل بیماریزا می‌تواند نقش مؤثری در ایجـاد عفونـت‌هـای سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چند دارویی داشته باشد.

در مطالعه انجام شده، جدایه هـا بیشـترین مقاومـت را بـه اریترومایسین و سفوکسیتین ۸۹ (۹۵/٦درصد) و کمترین درصد مقاومت را به آمیکاسین ۲۵ (۲٦/۸ درصد) نشان دادند. ۸۸ جدایه (۹٤/٦ درصد) به عنوان جدایه‌هایی با مقاومت چند دارویی در نظر گرفته شدند. از این میان ۸۵ جدایه (۹٦/۵ درصد) حامل ژن *phzI* و ۸۲ جدایه (۹۳/۱ درصد) حامل ژن *phzII* بودنـد کـه بالاترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند.

تشکر و قدردانی

مقالـه حاضـر برگرفتـه از پایـان‌نامـه کارشناسـی ارشـد میکروب‌شناسی است و نویسندگان مقاله از گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و از سرکار خانم غزال نادری به‌دلیل همکاری در انجام این تحقیق کمال تشکر را دارند.

منابع

[1] Morales E, Cots F, Sala M, Comas M, Belvis F, Riu M, Salvadó M, Grau S, Horcajada JP, Montero MM, Castells X. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa acquisition. BMC Health Services Research 2012; 12: 122.

[2] Grant GD, Zhang TT, Gloyne LS, Perkins AV, Kiefel MJ, Anoopkumar-Dukie S. Exogenous Pyocyanin Alters Pseudomonas aeruginosa Susceptibility to Ciprofloxacin. American Journal of Microbiology 2010; 1(1): 9-13.

[3] Karatuna O, Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in Pseudomonas aeruginosa respiratory isolates. Clin Microbiol Infect 2010; 16(12): 1770-5.

[4] Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(1): 43-8.

[5] Chaudhari V, Gunjal S, Mehta M. Antibiotic resistance patterns of Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital in Central India. Int J Med Sci Public Health 2013; 2(2): 386-9.

[6] Eriksen HM, Iversen BG, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospital in Norway, 2002 and 2003. J Hosp Infect 2005; 60(1): 40-5.

[7] Moore NM, Flaws ML. Antimicrobial resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa. Clin Lab Sci 2011; 24(1): 47-51.

[8] Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, Gardam MA. Outbreak of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. Infect Control Hosp Epidemiol 2009; 30(1): 25-33.

[9] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms.

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

Clin Microbiol Rev 2009; 22(4): 582-610.

[10] Tumbarello M, Repetto E, Trecarichi EM, Bernardini C, De Pascale G, Parisini A, Rossi M, Molinari MP, Spanu T, Viscoli C, Cauda R, Bassetti M. Multidrug- resistant Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: risk factors and mortality. Epidemiol Infect 2011; 139(11): 1740-9.

[11] Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, Mckerrow JH, Sakanari JA. By McGraw-Hill Education. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E (Lange) 27th Edition, 2016; p: 183-5.

[12] Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, Alhede M. Pseudomonas aeruginosa biofilms: mechanisms of immune evasion. Adv Appl Microbiol 2014; 86: 1-40.

[13] Price-Whelan A, Dietrich LEP, Newman DK. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. Nature Chemical Biology 2006; 2: 71-8.

[14] Mentel M, Ahuja EG, Mavrodi DV, Breinbauer R, Thomashow LS, Blankenfeldt W. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. Chembiochem 2009; 10(14): 2295-304.

[15] Liang H, Duan J, Sibley CD, Surette MG, Duan K. Identification of mutants with altered phenazine production in Pseudomonas aeruginosa. J Med Microbiol 2011; 60(Pt 1): 22-34.

[16] Engel JN. Molecular pathogenesis of acute Pseudomonas aeruginosa infections. In: Hauser AR, Rello J. Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003; p: 201-29.

[17] Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV, Parejko JA, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Mazurier S, Heide L, Blankenfeldt W, Weller DM, Thomashow LS. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. Appl Environ Microbiol 2010; 76(3): 866-79.

[18] Hall GS. Nonfermenting and miscellaneous Gram negative bacilli. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. Ohio: Saunders-Elsevier; 2007; p: 564-84.

[19] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M2-A9. Wayne, 2013. Available from: www.clsi.org

[20] Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5783-92.

[21] Wolf P, Elsässer-Beile U. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. Int J Med Microbiol 2009; 299(3): 161-76.

[22] Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, pel, and psl. Front Microbiol 2011; 2(2): 167.

[23] Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD, Kim EC, Choe KW. Pseudomonas aeruginosa bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. Clin Infect Dis 2003; 37(6): 745-51.

[24] Arora D, Jindal N, Kumar R, Romit. Emerging Antibiotic Resistance in Pseudomonas-A

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 11:42 IRDT on Monday May 20th 2019

Challenge. Int J Pharm Pharm Sci 2011; 3(2): 82-4.

[25] Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat Rev Microbiol 2005; 3(4): 307-19.

[26] Pierson LS 3rd, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 86(6): 1659-70.

[27] Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. Newman. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of Pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol 2006; 61(5): 1308-21.

[28] Starkey M, Rahme LG. Modeling Pseudomonas aeruginosa pathogenesis in plant hosts. Nat Protoc 2009; 4(2): 117-24.

[29] Jamali S, Shahid M, Sobia F, Singh A, Khan HM. AmpC β-lactamases among Pseudomonas and Acinetobacter species isolates, from a tertiary hospital of North India. International Journal of Advanced Research 2015; 3(2): 361-7.

[30] Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaeed S, Hossinpour M, Amir-Alvaei S, Araghian A. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among Pseudomonas aeruginosa, isolated from burn patients in Guilan, Iran. Iran J Microbiol 2013; 5(1): 36-41. (Persian)

[31] Imani Foolad A, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods. J Ardabil Univ Med Sci 2010; 10(3): 189-98. (Persian)

[32] Dadmanesh M, Pilehvarzadeh M, Eramabadi M, Eramabadi P, Bagheri Moghadam M, Mashayekhi F. Community Acquired Pseudomonas aeroginosa Urinary Tract Infections in Children Hospitalized in a Baqiatallah Hospital, Tehran, Iran: Virulence Profile and Antibiotic Resistance Properties. Biosci Biotech Res Asia 2014; 11(12): 417-26. (Persian)

[33] Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolated From Iranian Hospital Infections. Iran Red Crescent Med J 2014; 16(10): e15722. (Persian)