

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

Farnaz Tutunchi<sup>1</sup>, Habib Zeighami<sup>2\*</sup>

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

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

فرناز توتونچی<sup>۱</sup>، حبیب ضیغمی<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروپزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، زنجان، کدپستی: ۴۵۱۳۹۵۶۱۱۱، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، گروه میکروپزشکی

Email: zeighami@zums.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۲/۰۲

دریافت مقاله: ۹۴/۱۰/۲۵

## چکیده

**هدف:** سودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت طلب 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 (*phzH phzS phzM phzII phzI*) 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-بائر و طبق توصیه CLSI انجام شد. DNA جدایه‌ها به روش جوشاندن استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای هر کدام از ژن‌های *phzH phzS phzM phzII phzI* حضور یا عدم حضور ژن‌های مربوطه با PCR بررسی شد.

**نتایج:** در بین ۹۳ جدایه بیشترین درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به اریترومايسين 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 (۹۶/۵ درصد) حامل ژن *phzI* ۸۲ جدایه (۹۳/۱ درصد) حامل ژن *phzII* ۴۰ جدایه (۴۵/۴ درصد) حامل ژن *phzM* ۲۴ جدایه (۲۷/۲ درصد) حامل ژن‌های *phzH* و *phzS* بودند.

**نتیجه‌گیری:** بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا به دلیل 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 به دست آمده از منابع مختلف بالاست که می‌تواند هشدار 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*) ارگانیزمی گرم منفی و هوازی است که مهم‌ترین گونهٔ بیماری‌زای آن در انسان، سودوموناس

### ژن‌های مولد فنازین در سودوموناس آئروژینوزا

توسط عوامل مختلف، مهم‌ترین عامل شیوع این عفونت‌ها در بیمارستان‌ها است [۱۱]. سودوموناس آئروژینوزا برای ایجاد عفونت از عوامل بیماری‌زایی داخل سلولی و ترشحی استفاده می‌کند که شامل فلاژل (*Felagellum*)، لیپو پلی ساکارید، فنازین‌ها (*Phenazine*)، پروتازها، 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 به دلیل 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 زخم‌های چرکی بیماران ترشح می‌شد [۱۴]. آن‌ها منبعی برای متابولیت‌هایی مانند آمینواسیدهای آروماتیک، سیدروفورها (*Siderophores*) و کوئینین‌ها (*Quinone*) هستند. از دیدگاه بیوتکنولوژی، اهمیت فنازین‌ها مربوط به خواص فیزیوشیمیایی آن‌ها می‌شود که شامل خواص اکسیداسیون و کاهش رنگدانه‌های درخشان آن‌ها و توانایی تغییر رنگ با وضعیت pH و اکسیداتیو است. فنازین‌ها فشار اکسیداتیو داخل سلولی را به واسطه چرخه اکسایش و کاهش، افزایش داده، سوپر اکسید تولید می‌کند [۱۵]. این ترکیبات می‌تواند فعالیت میتوکندری، تکثیر سلولی، ترشح سایتوکاین و تولید دیسموتاز در نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها را مهار کند [۱۶]. 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 *phzA1* *phzA1B1C1D1G1* و *phzA2* *phzA2B2C2D2G2*، سنتز ترکیبات فنازین را به عهده دارند. 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

آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) است. بعد از اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) سومین بیماری‌زای فرصت طلب بیمارستانی شناخته شده [۱] و عامل عفونت‌های خطرناک خونی، ریوی، زخم و سوختگی به خصوص در افراد با نقص ایمنی است [۲]. این تنوع در عفونت‌های سودوموناسی به دلیل گسترش ساز و کارهای مختلف اکتسابی از جمله تنظیم بیان ژن است. به علاوه با تشکیل بیوفیلم توانایی محافظت در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضد میکروبی مختلف را ایجاد می‌کند [۳]. با مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های مقاوم به چند دارو (*Multi Drug Resistance: MDR*) در سراسر جهان به طور فزاینده‌ای افزایش یافته است [۴]. در صورت درمان سریع احتمال بهبودی عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد، ولی هیچ آنتی‌بیوتیکی قادر به ریشه‌کنی عفونت‌های مزمن آن نیست [۵]. افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشکلات زیادی در درمان بیماران ایجاد نموده و موجب افزایش مرگ و میر شده است [۶]. مقاومت دارویی سودوموناس آئروژینوزا به دلیل ساز و کارهای مختلفی مانند، تولید آنزیم‌های سفالوسپوریناز (*Cephalosporinase*) (به دلیل 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 می‌شود [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 ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها باعث پیچیده‌تر شدن درمان عفونت‌های 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

(Pyocyanin) مورد نیاز است [۱۵]. فنازین‌ها به‌عنوان عوامل بیماری‌زا به تشکیل بیوفیلم کمک کرده و به‌عنوان پیام‌های سلول عمل می‌کند که الگوهای بیان ژن را تنظیم می‌کند. 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 مطالعه حاضر با توجه به اهمیت فنازین‌ها در فرآیند بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا، فراوانی ژن‌های فنازین (*phzH phzS phzM phzII phzI*) در جدایه‌های بالینی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این جدایه‌ها بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی مقطعی، ۹۳ جدایه از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، ترشحات تنفسی، مدفوع و زخم طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ از سه بیمارستان شهر زنجان جداسازی شد (نمونه‌های مورد بررسی طبق مصوبه شماره ۱۳۸۳۰۵۰۷۹۳۲۰۱۴ در دسترس قرار گرفت). برای تأیید جدایه‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی مرسوم استفاده شد [۱۸]. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک (Disk diffusion) [کربی-بائر (Kirby-bauer)] طبق توصیه CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) انجام شد [۱۹]. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده محصول شرکت MAST انگلستان و به شرح زیر بودند: آموکسی‌سیلین (Amoxicillin) (۲۵ میکروگرم)، آمیکاسین (Amikacin) (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (Aztreonam) (۳۰ میکروگرم)، اریترومايسين (Erythromycin) (۱۵ میکروگرم)، ایمی‌پنم (Imipenem) (۱۰ میکروگرم)، تتراسیکین (Tetracycline) (۳۰ میکروگرم)، جتتامیسین (Gentamicin) (۱۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (Cefoxitin) (۳۰ میکروگرم)، سفوتازیدیم (Ceftazidime) (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (Cefotaxime) (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکسولین (Ciprofloxacin) (۵ میکروگرم).

کوآموکسی کلاو (co Amoxiclav) (۳۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (Cotrimoxazole) (۲۵ میکروگرم). پس از انجام انتشار دیسک، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن با توجه به استانداردهای CLSI به‌صورت حساس، مقاوم و بینابینی گزارش شد. سویه سودوموناس آئروژینوزای ATCC<sub>10145</sub> به‌عنوان سویه استاندارد برای کنترل آنتی‌بیوگرام استفاده شد. به‌منظور شناسایی ژن‌های فنازین (*phzS phzM phzII phzI*) ابتدا DNAی تمام جدایه‌ها با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد. به طوری که ابتدا یک سوسپانسیون نسبتاً غلیظ از باکتری تهیه شد و بعد از ورنکس (Vortex)، سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از اضافه کردن بافر TE (Tris EDTA) و سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و سپس بلافاصله روی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. در مرحله آخر با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی حاوی DNA استخراجی به میکروتیوب‌های استریل منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگرهای (Primers) اختصاصی برای هر ژن انجام شد (جدول ۱) [۲۰]. به این صورت که ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شد، ۱ میکرولیتر آغازگر ۱۰ پیکومول از هر آغازگر و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر به ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی PCR (PCR Mastermix) (Fermentas، آمریکا) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه شد. از سودوموناس آئروژینوزای PAO1 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. ژن‌های مذکور طبق برنامه جدول ۲ به روش PCR تکثیر شد. لازم به ذکر است برای ژن‌های *phzH* و *phzII* به علت هم‌دما بودن، PCR مضاعف (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

## ژن‌های مولد فنازین در سودوموناس آئروژینوزا

محصولات تکثیر شده استفاده شد.

جفت باز (Fermentas، آمریکا) برای تأیید وزن مولکولی

جدول ۱ آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های فنازین

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

جدول ۲ برنامه چرخه‌های PCR برای شناسایی ژن‌های مورد بررسی

برنامه	نوع عملیات	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
۱	واسرشتگی اولیه	۹۴	۵	۱
	واسرشتگی	۹۴	۱	
۲	اتصال	<i>phzM</i>	۵۴	۳۰
		<i>phzS</i>	۶۳	
		<i>phzH</i>	۵۱	
		<i>phzI</i>	۴۹	
		<i>phzII</i>	۵۱	
۳	طولیل شدن	۷۲	۱	۱
	طولیل شدن نهایی	۷۲	۱۰	
۴	طولیل شدن نهایی	۷۲	۱۰	۱

## نتایج

مقاومت مربوط به اریترومايسين (۹۵/۶ درصد) و سفوکسیتین (۹۵/۶ درصد) و کمترین درصد مقاومت مربوط به آمیکاسین (۲۶/۸ درصد) بود. بررسی این الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، میزان بالای مقاومت سویه‌های جدا شده را در مورد اکثریت آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد. نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به صورت مقاوم، بینابینی و حساس برای هر آنتی‌بیوتیک به روش انتشار دیسک، در جدول ۳ گزارش شده است. جدایه‌ها بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در برابر بتالاکتام‌ها و بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی را در برابر فلوروکینولون‌ها (Fluoroquinolones) به میزان ۵۰/۵

از ۹۳ جدایه سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی ۳۱ جدایه (۳۳ درصد) مربوط به نمونه‌های ادرار، ۲۶ جدایه (۲۸ درصد) مربوط به نمونه‌های خون، 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 بیشترین درصد

نتایج PCR نشان داد از ۹۳ جدایه، ۴۲ جدایه (۴۵/۱ درصد) حامل ژن *phzM*، ۹۰ جدایه (۹۶/۷ درصد) حامل ژن *phzI*، ۲۶ جدایه (۲۷/۹ درصد) حامل ژن *phzH*، ۸۴ جدایه (۹۰/۳ درصد) حامل ژن *phzII* و ۲۶ جدایه (۲۷/۹ درصد) حامل ژن *phzS* بودند (جدول ۵). لازم به ذکر است تنها ۱ نمونه ادرار شامل همه ژن های مورد بررسی بود، اما به طور همزمان ۱۸ جدایه (۱۹/۳ درصد) حامل ۴ ژن و ۴۸ جدایه (۵۱/۵ درصد) حامل ۳ ژن بودند.

درصد نشان دادند. همچنین از ۹۳ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، ۸۸ جدایه (۹۴/۶ درصد) به بیش از سه خانواده از آنتی بیوتیک های مورد استفاده مقاوم بودند و به عنوان جدایه هایی با مقاومت چند دارویی در نظر گرفته شدند. از این میان، ۱۴ جدایه نسبت به ۳ کلاس از آنتی بیوتیک های مصرفی مقاوم و MDR سه تایی در نظر گرفته شدند و ۲۷ جدایه نسبت به ۶ خانواده آنتی بیوتیکی مقاومت نشان دادند و جز MDR شش تایی قرار گرفتند (جدول ۴).

جدول ۳ نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های مورد بررسی

کل نمونه: ۹۳			
آنتی بیوتیک	مقاوم، تعداد (درصد)	بینابینی تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
آزترونام	۳۹ (۹۴/۱)	۱۷ (۱۸/۲)	۳۷ (۳۹/۷)
سفوکسیتین	۸۹ (۹۵/۶)	-	۴ (۴/۳)
ایمی پنم	۳۱ (۳۳/۳)	-	۶۲ (۶۶/۶)
آموکسی سیلین	۸۵ (۹۱/۳)	۳ (۳/۲)	۵ (۵/۳)
سفتازیدیم	۳۱ (۳۳/۳)	۵ (۵/۳)	۵۷ (۶۱/۲)
سفوناکسیم	۴۷ (۵۰/۵)	۱۰ (۱۰/۷)	۳۶ (۳۸/۷)
کوآموکسی کلاو	۸۳ (۸۹/۲)	۱ (۱)	۹ (۹/۶)
تتراسایکلین	۳۲ (۳۴/۴)	۲۱ (۲۲/۵)	۴۰ (۴۳)
کوآتریموکسازول	۷۲ (۷۷/۴)	۶ (۶/۴)	۱۵ (۱۶/۱)
آمیکاسین	۲۵ (۲۶/۸)	۶ (۶/۴)	۶۲ (۶۶/۶)
جنتامیسین	۶۴ (۶۸/۸)	۱ (۱)	۲۸ (۳۰/۱)
سیپروفلوکساسین	۳۷ (۳۹/۷)	۹ (۹/۶)	۴۷ (۵۰/۵)
اریترومایسین	۸۹ (۹۵/۶)	-	۴ (۴/۳)

جدول ۴ بررسی انواع الگوهای MDR در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده

منابع جدایه ها	تعداد نمونه ها	تعداد MDR	انواع الگوهای MDR			
			سه تایی	چهار تایی	پنج تایی	شش تایی
ادرار	۳۱	۲۹	۴	۶	۸	۱۱
خون	۲۶	۲۴	۴	۵	۹	۶
تنفسی	۱۷	۱۶	۴	۴	۲	۶
خلط	۱۰	۱۰	۱	۳	۴	۲
مدفوع	۸	۸	۱	۳	۲	۲
زخم	۱	۱	-	-	۱	-
کل:	۹۳	۸۸	۱۴	۲۱	۲۶	۲۷

## ژن‌های مولد فن‌ازین در سودوموناس آئروژینوزا

جدول ۵ فراوانی ژن‌های فن‌ازین مورد بررسی در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا

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

عمومی است. به طوری 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 به حساب می‌آید [۲۶]. همچنین به عنوان مولکول‌های پیام رسان سلول به سلول عمل می‌کند و علیه باکتری‌های دیگر فعالیت مهارکنندگی دارد [۲۷]. این سمیت فن‌ازین‌ها به دلیل فعالیت اکسایش-کاهش (-Oxidation: redox) ذاتی آن‌ها است. مطالعات انجام شده در مدل عفونت‌های حیوانی و گیاهی نیز نقش بیماری‌زای فن‌ازین‌ها را مشخص کرده‌است [۲۸]. در مطالعه 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 اریترومايسين 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 جدایه‌هایی 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

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

## بحث

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل فرصت طلب 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]. به علت بیماری‌زایی بالا و نقش برجسته آن در بیماری‌زایی انسان به خوبی مطالعه شده است. همچنین این ارگانسیم 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 به دلیل دارا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌های متداول مشکل است [۲۳، ۲۴]. گفته شده، مقاومت به عوامل ضد میکروبی تهدیدی جدی برای سلامت

مورد سایر آنتی‌بیوتیک‌های فوق در مطالعه حاضر افزایش یافته است [۳۰].

فینان (Finnan) و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در بروکسل و ایرلند با جداسازی ۱۲ جدایه از بیماران مبتلا به سیستمیک فیروزیس، فراوانی ژن‌های *phzM* (۹۱/۶ درصد)، *phzII* (۱۰۰ درصد)، *phzH* (۱۰۰ درصد)، *phzI* و *phzS* (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 بقیه‌الله تهران روی ۲۳ جدایه با مقاومت چند دارویی، میزان فراوانی ژن‌های فنازین *phzI* (۳۰/۴ درصد)، *phzH* (۱۳/۴ درصد)، *phzII* (۲۶ درصد)، *phzM* (۴۳/۴ 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 به علت مطالعه روی یک نمونه خاص باشد. در سال ۲۰۱۴ فاضلی و همکارانش در رابطه با عفونت‌های بالینی بیمارستان بقیه‌الله تهران روی ۱۰۲ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، میزان فراوانی ژن‌های فنازین را این گونه گزارش کردند: *phzI* (۱۱/۷ درصد)، *phzH* (۲۰/۵ درصد)، *phzII* (۲۸/۴ درصد)، *phzM* (۳۶/۲ درصد) و *phzS* (۱۹/۶ درصد) [۳۲]. میزان فراوانی ژن‌های *phzM* و *phzS* تا حدودی با مطالعه حاضر همسواست. 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 می‌توان نتیجه گرفت، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای پیشرفته در مقایسه با کشور ما، ایران، و شهر زنجان پایین‌تر بوده و احتمالاً به دلیل مصرف کنترل‌شده آنتی‌بیوتیک‌ها است. میزان بالای عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا با

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* (۲۴ درصد) و *phzII* (۲۷/۲ درصد) ۲۶ (۲۹/۵ درصد) در MDR ۶ تایی در مقایسه با جدایه‌های دارای ژن‌های *phzM*، *phzS* و *phzH* بیشتر بود. لازم به‌ذکر است تنها ۱ نمونه ادرار شامل همه ژن‌های مورد بررسی بود، اما به‌طور همزمان ۱۸ جدایه (۱۹/۳ درصد) حامل ۴ ژن، ۴۸ 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 جتتامیسین ۶۷/۵ درصد. می‌توان گفت میزان مقاومت جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به سفوکسیتین و جتتامیسین با مطالعه حاضر مشابه است، اما در مورد آمیکاسین اختلاف زیادی وجود دارد که می‌تواند مربوط به زمان و شرایط مطالعه یا به دلیل 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 ایمپنم ۲۳/۳ درصد، آمیکاسین ۴۸/۸ درصد، جتتامیسین ۳۷/۲ درصد و سیپروفلوکساسین ۶۳/۳ درصد گزارش شد که تنها میزان مقاومت به ایمپنم (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 به ترتیب ۹۶/۴ درصد و ۹۲/۷ درصد و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین، جتتامیسین و آمیکاسین را به ترتیب ۲۵/۵ درصد، ۲۰/۹ درصد، ۲۵/۵ درصد، ۱۷/۳ درصد گزارش کردند که مقادیر آموکسی‌سیلین، آمیکاسین و سفنازیدیم با نتایج بررسی حاضر تا حدودی مطابقت دارد و میزان مقاومت در



## ژن‌های مولد فن‌ازین در سودوموناس آئروژینوزا

مقاومت چند دارویی در بیمارستان‌های کشور نگران‌کننده است و آگاهی، نظارت مستمر و انتخاب درست آنتی بیوتیک برای کنترل و جلوگیری از گسترش گونه‌های مقاوم ضروری است. همچنین با توجه به تحقیقاتی که در رابطه با فراوانی فن‌ازین‌ها و ارتباط بین این ژن‌ها با مقاومت چند دارویی صورت گرفته است، می‌توان نتیجه گرفت ژن‌های فن‌ازین به عنوان عوامل بیماری‌زا می‌تواند نقش مؤثری در ایجاد عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چند دارویی داشته باشد. در مطالعه انجام شده، جدایه‌ها بیشترین مقاومت را به اریترومايسين و سفوکسیتین ۸۹ (۹۵/۶ درصد) و کمترین درصد مقاومت را به آمیکاسین ۲۵ (۲۶/۸ درصد) نشان دادند. ۸۸ جدایه

## تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی است و نویسندگان مقاله از گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و از سرکار خانم غزال نادری به دلیل همکاری در انجام این تحقیق کمال تشکر را دارند.

مقاومت چند دارویی در بیمارستان‌های کشور نگران‌کننده است و آگاهی، نظارت مستمر و انتخاب درست آنتی بیوتیک برای کنترل و جلوگیری از گسترش گونه‌های مقاوم ضروری است. همچنین با توجه به تحقیقاتی که در رابطه با فراوانی فن‌ازین‌ها و ارتباط بین این ژن‌ها با مقاومت چند دارویی صورت گرفته است، می‌توان نتیجه گرفت ژن‌های فن‌ازین به عنوان عوامل بیماری‌زا می‌تواند نقش مؤثری در ایجاد عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چند دارویی داشته باشد. در مطالعه انجام شده، جدایه‌ها بیشترین مقاومت را به اریترومايسين و سفوکسیتین ۸۹ (۹۵/۶ درصد) و کمترین درصد مقاومت را به آمیکاسین ۲۵ (۲۶/۸ درصد) نشان دادند. ۸۸ جدایه

## 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.

- 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) 27<sup>th</sup> 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](http://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*

- 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  $\beta$ -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 aeruginosa* 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)