

Genetic Identification and Determination of Antibiotic Susceptibility Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from Burn Unit of Payambar e Azam Hospital in Bandar Abbas

Fatemeh Khalighi ¹, Saeid Tamadoni Jahromi ^{*2}, Seyed Morteza Seifati ³

¹ Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran

² Assistant prof., Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

³ Assistant prof., Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran

Received: 15 July 2019 Accepted: 10 September 2019

Abstract

Background and Aim: For proper treatment and control of nosocomial infections, it is necessary to know the resistance pattern of pathogenic microorganisms. The aims of the present study were to compare phenotypic and genotypic detection of *pseudomonas aeruginosa* and to determine the frequency of antibiotic resistant isolates from clinical samples of burn unit of Payambar e Azam Hospital in Bandar Abbas in 2016.

Methods: Morphological, biochemical and genetic identification methods based on 16s rRNA sequencing were used. Kirby Bauer method was used to determine antibiotic susceptibility according to CLSI guidelines.

Results: Of 50 *Pseudomonas* isolates, 27% of isolates were from skin samples and 73% from wound samples. The results of antibiotic susceptibility pattern showed that 46.15, 15.38, 46.15, 23.08, 15.38, 15.38 and 38.46% of the tested isolates were resistant to ciprofloxacin, imipenem, piperacillin, ceftazidime, respectively. Amikacin, azithromycin and cefepime showed resistance. This pattern for wound-derived isolates was recorded as 80.56, 25, 80.56, 27.78, 16.67, 33.33, 41.67 respectively. The results of genetic identification of 5 isolates confirmed phenotypic ones although these results did not confirm phenotypic results for W23 isolate. Phylogenetic studies revealed that S11 isolate had exposed evolutionary divergency rather than other examined isolates.

Conclusion: The presented results showed high antibiotic resistance especially to ciprofloxacin and piperacillin among examined isolates and emphasized on application of effective antibiotics and their limited prescription. The necessity of genetic identification of *Pseudomonas* strains is also suggested.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance, Antibiogram, Genetic identification.

*Corresponding author: Saeid Tamadoni Jahromi. Email: stamadoni@gmail.com

Address: Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

شناسایی ژنتیکی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای سودوموناس جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی بخش سوختگی بیمارستان پیامبر اعظم بندرعباس

فاطمه خلیقی^۱، سعید تمدنی جهرمی^{۲*}، سید مرتضی سیفتی^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکنذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکنذر، یزد، ایران

^۲ استادیار پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر عباس، ایران

^۳ استادیار مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکنذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکنذر، یزد، ایران

دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۶/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: برای درمان مناسب و کنترل عفونت‌های بیمارستانی لازم است از الگوی مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا آگاهی داشته باشیم. مطالعه حاضر با هدف مقایسه روش‌های تشخیص فنوتیپی و ژنوتیپی سودوموناس آئروژینوزا و فراوانی درصد مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها بر روی نمونه‌های بالینی بخش سوختگی بیمارستان پیامبر اعظم بندرعباس در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه از روش‌های شناسایی مورفولوژیک، بیوشیمیایی و ژنتیک بر اساس تعیین توالی *16s rRNA* استفاده شد. به منظور تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی از روش کربی بائر و طبق دستورالعمل CLSI استفاده شد.

یافته‌ها: از ۵۰ ایزوله متعلق به جنس سودوموناس ۲۷٪ ایزوله‌ها از نمونه پوست و ۷۳٪ از نمونه‌های زخم جداسازی شدند. نتایج الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد به ترتیب ۴۶/۱۵، ۱۵/۳۸، ۴۶/۱۵، ۲۳/۰۸، ۱۵/۳۸، ۱۵/۳۸ و ۳۸/۴۶ درصد از ایزوله‌های مورد آزمون در مقابل سیپروفلوکساسین، ایمی پنم، پپراسیلین، سفتازیدیم، آمیکاسین، آزیترومایسین و سفیمیم مقاومت نشان دادند. در حالیکه این میزان برای ایزوله‌های جدا شده از زخم به ترتیب ۸۰/۵۶، ۲۵، ۸۰/۵۶، ۲۷/۷۸، ۱۶/۶۷، ۳۳/۳۳ و ۴۱/۶۷ درصد ثبت شد. نتایج شناسایی ژنتیکی ایزوله‌ها علیرغم انطباق با نتایج فنوتیپی در مورد ۵ ایزوله، تنها در مورد ایزوله W23 با نتایج فنوتیپی مطابقت نشان نداد. مطالعات فیلوژنتیک واگرایی تکاملی ایزوله *S11* را نسبت به سایر ایزوله‌های مورد مطالعه تایید نمود.

نتیجه گیری: نتایج ارائه شده مقاومت بالای ایزوله‌های مورد بررسی را به ویژه نسبت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و پپراسیلین نشان داد و بر بکارگیری آنتی بیوتیک‌های موثر و مصرف کنترل شده آنها تاکید نمود. همچنین ضرورت انجام شناسایی ژنتیکی سویه‌های سودوموناس را پیشنهاد می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت به آنتی بیوتیک، آنتی بیوگرام، شناسایی ژنتیکی.

*نویسنده مسئول: سعید تمدنی جهرمی. پست الکترونیک: stamadoni@gmail.com

آدرس: پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر عباس، ایران.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک عامل بیماری‌زای فرصت‌طلب در افرادی که دچار نقص یا تضعیف سیستم ایمنی بوده و مبتلایان به سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آنها به نحوی تضعیف یا سرکوب شده است عفونت ایجاد می‌نماید (۱). گونه‌های جنس سودوموناس به‌عنوان دومین عامل عفونت‌های سوختگی و سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی محسوب می‌شوند (۲). مرگ و میر ناشی از آن معمولاً بدلیل سپتی‌سمی بوده و ارتباط مستقیمی با درصد سوختگی دارد. همچنین این باکتری یکی از عوامل شایع جداسازی شده از زخم‌های جراحی است. فراوانی این باکتری به عوامل مختلف از جمله به محل، وسعت و همچنین وضعیت بالینی بیمار وابسته می‌باشد (۳). در مطالعات انجام شده در ایالات متحده، بروز آن در زخم‌های جراحی، ۸ درصد و در بیماران ICU، ۱۰ درصد گزارش شده است (۴).

بدلیل مقاومت ذاتی این باکتری به اکثر آنتی بیوتیک‌های متداول، مرگ و میر ناشی از عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا بسیار شایع است، به طوری که مطالعات نشان داده است این باکتری سبب مرگ در ۷۰ درصد از افرادی است که به پنومونی ناشی از این باکتری مبتلا شده‌اند (۵). همچنین باکتری عامل ۱۲ درصد از عفونت‌های مجاری ادراری بیمارستانی، ۱۶ درصد از بیماران مبتلا به ذات‌الریه بیمارستانی، ۸ درصد از عفونت‌های زخم‌های جراحی و ۱۰ درصد از سپتی‌سمی‌ها است (۶). اخیراً ظهور سویه‌های واجد مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی (MDR) سبب بروز مشکلاتی در درمان عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم‌ها در انسان‌ها و حیوانات شده است (۷).

نتایج مطالعات گذشته نشان داده است منشاء اصلی استعداد بالای اعضای این جنس به بروز مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، مواد ضدعفونی کننده، شوینده‌ها، فلزات سنگین و حلال‌های آلی، ژنوم منعطف این باکتری‌ها بوده که موجب گرایش بالای آنها به پذیرش تغییرات ژنتیکی با مکانیسم‌های مختلف نظیر ورود عوامل ژنتیکی خارج کروموزومی مانند پلاسمیدها، اینتگرون‌ها و غیره می‌باشد (۸). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در دنیا ۳۰-۱۰

درصد سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک ایمپینم مقاوم هستند (۹).

جهت درمان مناسب و کنترل عفونت‌های بیمارستانی نیاز به دانستن الگوی مقاومت میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشد. متاسفانه اطلاعات مناسبی در مورد میزان مقاومت سویه‌های سودوموناس به آنتی بیوتیک‌های مختلف وجود ندارد. از مهمترین مکانیسم‌های مختلفی که این باکتری جهت مقاوم شدن به آنتی بیوتیک‌ها استفاده می‌کند، شامل تولید آنزیم بتالاکتاماز، تخلیه آنتی بیوتیک بوسیله پمپ‌های خارج کننده دارو و تغییر در نفوذپذیری غشاء می‌باشد. بنابراین با توجه به عفونت‌های متنوعی که به وسیله باکتری سودوموناس آئروژینوزا ایجاد می‌شود و هم چنین مقاومت بالای آنتی بیوتیکی این باکتری، تشخیص به موقع جهت درمان دارویی سریع و مناسب از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۱۰).

تشخیص کلاسیک این باکتری معمولاً بر مبنای روش‌های میکروسکوپی و کشت انجام می‌شود. این تکنیک‌ها وقت گیر، با حساسیت نسبتاً پائین و نیازمند امکانات و همین‌طور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج می‌باشد. در چند دهه گذشته، روش‌های مولکولی متعددی به ویژه روش‌هایی بر مبنای تکثیر توالی اسیدهای نوکلئیک اختصاصی پاتوژن‌ها توسعه یافته‌اند که امکان شناسایی سریع میکروارگانیسم‌ها با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالا نسبت به روش‌های سنتی را مهیا ساخته‌اند. یکی از مهم‌ترین این روش‌ها، تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) است (۱۱). روش PCR به علت سریع و قابل اعتماد بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در همه این روش‌ها ژن‌های خاصی به عنوان هدف مورد استفاده قرار می‌گیرند که از مهم‌ترین ژن‌های مربوط به 16S rDNA می‌باشد.

یکی از مهمترین معضلات موجود در جنگ‌های نوین سوختگی است. اهمیت این مسئله بویژه در نیروی دریایی بدلیل نوع درگیری در شناورهای نظامی و ارتباط پرسنل با مواد قابل اشتعال شایان توجه است. به غیر از درگیری‌های نظامی، موارد متعددی از وقوع سوختگی در مراحل مختلف تعمیرات، نگهداری و سایر موارد در صنایع نظامی دریایی محتمل می‌باشد. در این زمینه ایجاد درک

جدیدی از وضعیت حساسیت عوامل عفونت‌زای زخم‌های سوختگی به آنتی بیوتیکی‌های درمانگر بویژه در مناطق اصلی استقرار نیروی دریایی از جمله بندرعباس ضروری و راهگشا می‌باشد. بدلیل تفاوت الگوی پراکندگی ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک در کانون‌های جمعیتی انجام این مطالعه در مناطق مختلف ضروری می‌باشد. با توجه به کثرت عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری بیماری‌زای فرصت طلب، هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژنتیکی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری در بیمارستان پیامبر اعظم بندرعباس طی سال ۱۳۹۵ می‌باشد.

روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، ۵۰ نمونه از زخم‌های سوختگی و پوست بیماران با استفاده از سواب پنبه‌ای از بیماران بستری در بخش سوختگی بیمارستان پیامبر اعظم طی سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد.

نمونه‌ها در لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه منتقل شد. به محض ورود به آزمایشگاه با استفاده از سواب استریل نمونه‌ها روی محیط کشت Cetrimide agar تلقیح گردیدند. محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلونی‌های جدا شده به محیط کشت‌های جدید منتقل شد و با استفاده از تکنیک کشت خطی پس از طی چند مرحله خالص‌سازی گردیدند. خلوص نمونه‌ها با استفاده از مشاهدات میکروسکوپی تایید شد.

شناسایی اولیه کل ایزوله‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و چند ویژگی بیوشیمیایی شامل تست‌های اکسیداز، کاتالاز، TSI، IMVIC شناسایی شدند. کلونی‌های خالص شده پس از طی مدت گرماگذاری بررسی شده و تعلق آنها به جنس سودوموناس با استفاده از مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد آزمون قرار گرفت (۱۲).

برای سنجش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها از روش استاندارد کربی بائر و طبق دستورالعمل CLSI استفاده شد (۱۳). بدین منظور از کشت ۲۱ ساعته باکتری سوسپانسیونی با کدورت نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه، سپس با استفاده از سواب پنبه‌ای سترون

از سوسپانسیون باکتری به صورت یکنواخت در سطح محیط مولر هینتون آگار تلقیح گردید.

پس از چند دقیقه، دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک خریداری شده از شرکت پادتن طب را با استفاده از پنس سترون در سطح محیط کشت قرار داده، سپس پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۵ °C به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شدند. قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد و با استفاده از جدول استاندارد، وضعیت مقاومت و حساسیت هر یک از ایزوله‌ها به هر یک از آنتی بیوتیک‌ها مشخص شده و سپس ایزوله‌های دارای الگوی یکسان، در یک گروه قرار گرفتند.

آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی شامل آزیترومایسین ($\mu\text{g/ml}$ ۱۵)، سفپیم ($\mu\text{g/ml}$ ۳۰)، آمیکاسین ($\mu\text{g/ml}$ ۳۰)، سفنازیدیم ($\mu\text{g/ml}$ ۳۰)، پیراسیلین ($\mu\text{g/ml}$ ۱۰۰)، ایمپنم ($\mu\text{g/ml}$ ۱۰)، سیپروفلوکساسین ($\mu\text{g/ml}$ ۵) بودند.

باکتری‌های دارای بیشترین مقاومت آنتی بیوتیک بصورت ژنتیکی شناسایی شدند. استخراج DNA ژنومی ایزوله‌های مقاوم با استفاده از روش تغییر یافته Ezaki انجام شد. بدین منظور بیومس مناسب با توجه به مرحله رشد باکتری تهیه شد. بدنال آن انجام فرایند پاکسازی بیومس صورت گرفت. مراحل مختلف لیز سلولی، پروتئین زدایی و خالص‌سازی DNA ژنومی صورت گرفت (۱۴). کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل

آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تکثیر ژن 16S rRNA از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. از جفت پرایمرهای

(5' to 3' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 27F
(5'to3'ACGGCTACCTTGTTACGA) 1492R

جهت تکثیر ژن مربوطه استفاده شد (۱۵).

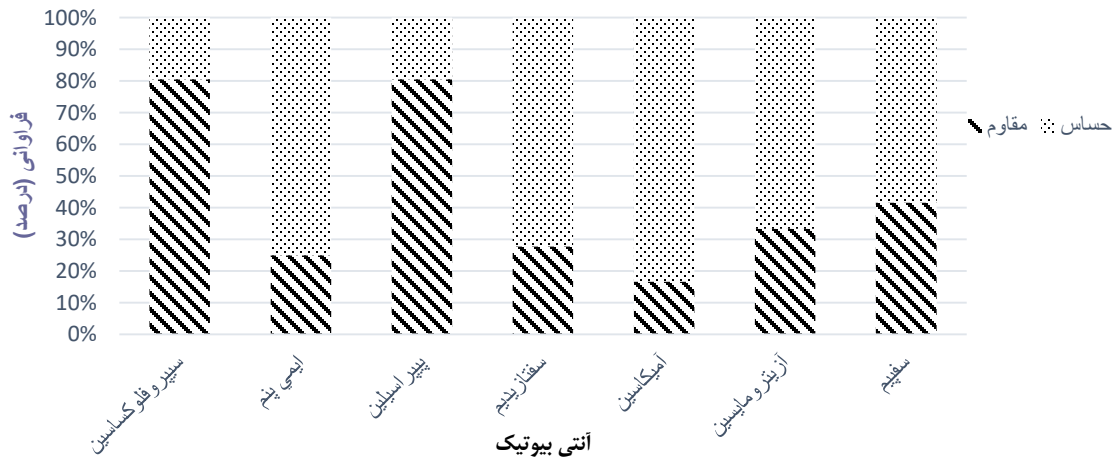
پس از انجام واکنش کیفیت محصول PCR تولید شده با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول PCR تولید شده طبق دستورالعمل شرکت Promega آماده‌سازی و با واسطه به شرکت مزبور ارسال شد. تعیین توالی ژن 16S rRNA تکثیر شده با استفاده از روش sanger و تکنیک Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit انجام گردید. تمامی آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد.

ایزوله‌های سودوموناس جدا شده از نمونه زخم بیانگر مقاومت ۸۰/۵۶ درصد ایزوله‌ها در مقابل سیپروفلوکساسین، ۲۵ درصد در مقابل ایمی پنم مقاومت، ۸۰/۵۶ درصد در مقابل پیراسیلین، ۲۷/۷۸ درصد در مقابل سفنازیدیم، ۱۶/۶۷ در مقابل آمیکاسین، ۳۳/۳۳ درصد در مقابل آزیترومایسن، ۴۱/۶۷ در مقابل سفپیم بود (نمودار-۱). این در حالیست که الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله جدا شده از پوست نشان داد ۴۶/۱۵، ۱۵/۳۸، ۴۶/۱۵، ۱۵/۳۸، ۲۳/۰۸، ۴۶/۱۵، ۱۵/۳۸ و ۳۸/۴۶ درصد در مقابل به ترتیب سیپروفلوکساسین، ایمی پنم، پیراسیلین، سفنازیدیم، آمیکاسین، آزیترومایسن و سفپیم مقاومت می باشد (نمودار-۲).

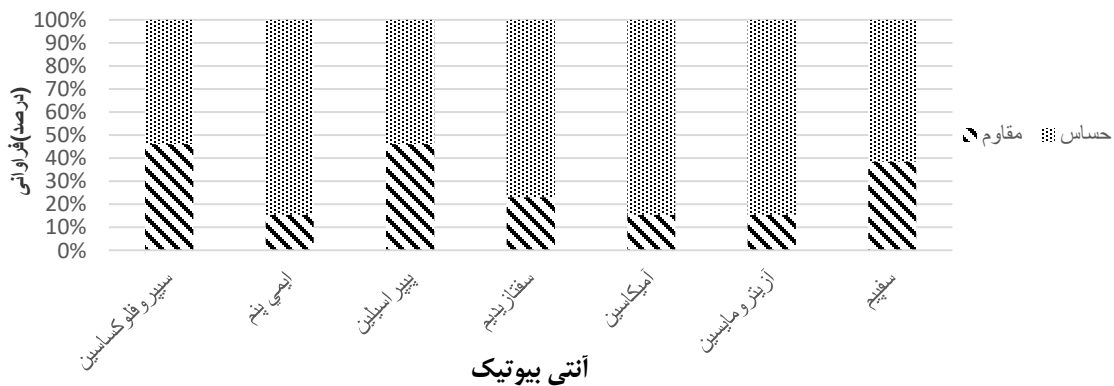
محاسبات آماری درصد حساسیت و مقاومت ایزوله‌های سودوموناس با استفاده از نرم افزار Excell 2013 Microsoft TM انجام گردید (Microsoft, Seattle, WA). معناداری آماری توپولوژی درخت ترسیم شده با آنالیز bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (۱۶) و با نرم افزار MEGA 7 محاسبه شد.

نتایج

یافته ها نشان داد ۵۰ ایزوله متعلق به جنس سودوموناس بودند. ۷۳ درصد ایزوله‌های سودوموناس از نمونه‌های زخم و ۲۷ درصد از نمونه پوست جداسازی شدند. نتایج الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی



نمودار-۱. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس جدا شده از نمونه زخم



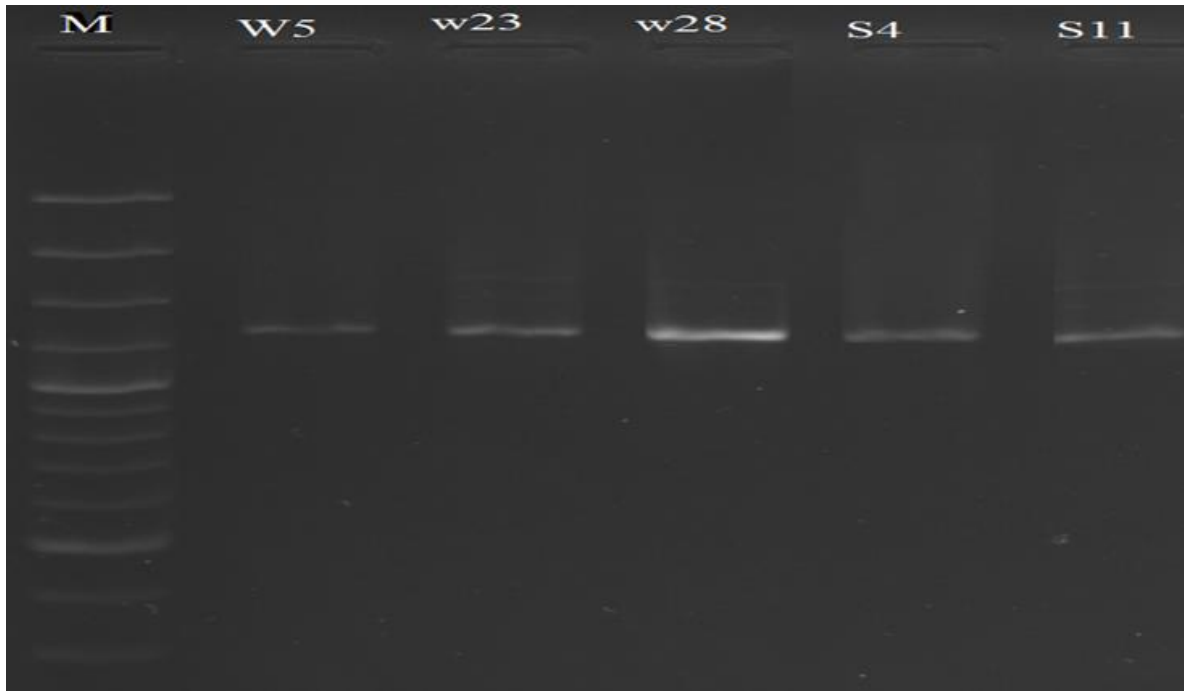
نمودار-۲. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس جدا شده از نمونه پوست

Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071
Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071
 با *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 10145
 میزان‌های بترتیب ۹۹، ۹۸، ۹۹ و ۹۹ درصد بود. نتایج حاصل از
 آنالیز فیلوژنتیک میان ایزوله‌های مذکور بر مبنای الگوریتم
 Neighbour joining نشان داد این سویه‌ها بصورت دو کلاسد مجزا
 از لحاظ تکاملی قرار گرفته‌اند. ایزوله‌های W23، S11، W5، W28 و
 در یک کلاسد قرار گرفته و ایزوله S4 در کلاسد دیگری واقع شده‌اند.
 بررسی تکاملی درخت فیلوژنتیک رسم شده نشان داد که هر دو کلاسد
 از یک جد مشترک انشقاق یافته‌اند و کلاسد دوم از لحاظ تکاملی زودتر
 از کلاسد اول افتراق حاصل نموده است. ایزوله‌های سودوموناس
 موجود در کلاسد اول در زیر خوشه‌های مختلف قرار گرفته‌اند و هر کدام
 سیر تکاملی جداگانه‌ای را با نزدیکترین سویه‌های شاخص دنبال
 نموده‌اند (شکل-۲).

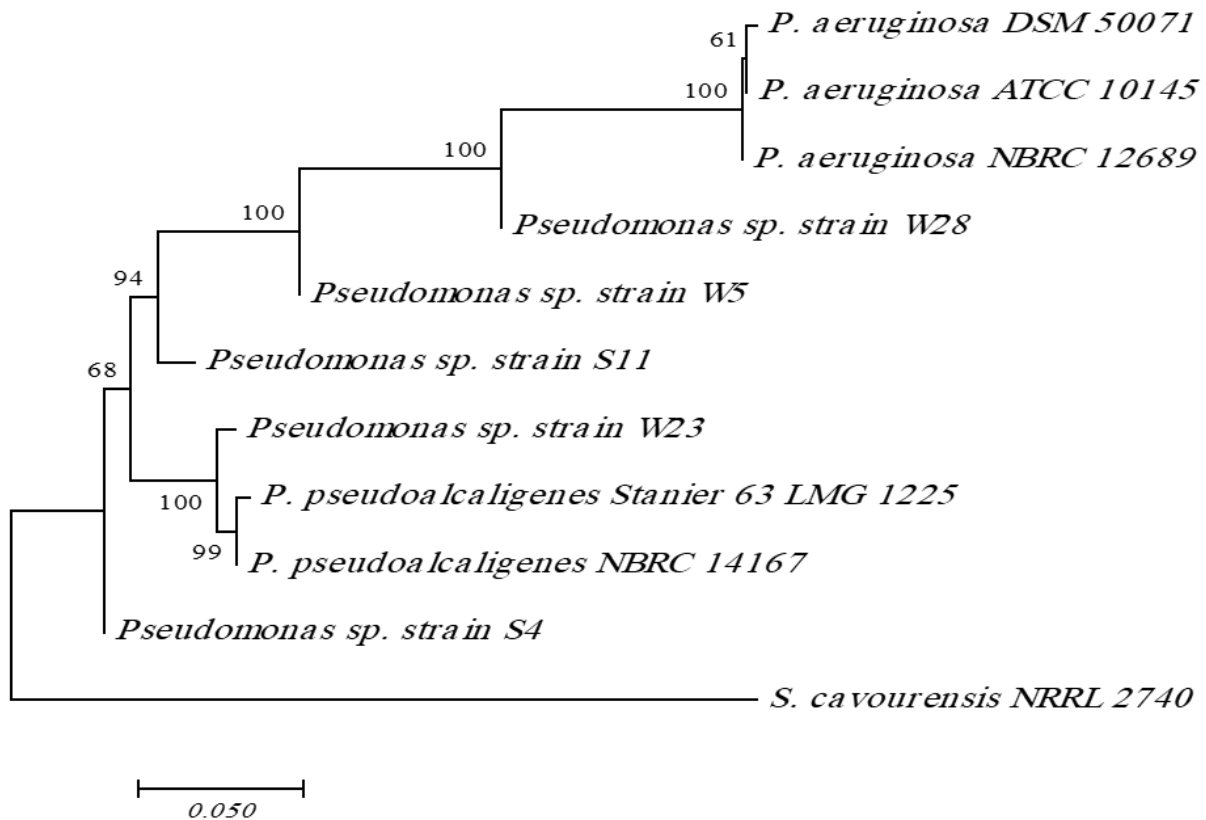
پنج ایزوله سودوموناس با بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی شامل
 W23، W5 و W28 جداشده از نمونه‌های زخم و ایزوله‌های S4 و
 S11 جداشده از نمونه‌های پوست به منظور شناسایی پلی فازی
 انتخاب شدند. ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی
 این ایزوله‌ها ثبت شد (جدول-۱). نتایج حاصل از الکتروفورز
 محصول PCR ژن 16S rRNA ایزوله‌های سودوموناس دارای
 بیشترین مقاومت بیانگر تکثیر توالی‌هایی با طول حدود ۱۵۰۰ bp
 بود. نتایج آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA ایزوله‌های بدست
 آمده با سویه‌های شاخص موجود در بانک ژن بیانگر میزان همولوژی
 بالای ۵ ایزوله سودوموناس دارای بیشترین مقاومت آنتی بیوتیک با
 سویه‌های موجود در بانک ژن بود. نتایج نشان داد ایزوله‌های W5،
 W23، W28، S4 و S11 بیشترین همولوژی را به ترتیب با
 سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071
 و *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain Stanier 63

جدول-۱. ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ایزوله‌های منتخب

مشخصه	S11	S4	W28	W23	W5	مشخصه	S11	S4	W28	W23	W5
واکنش گرم	-	-	-	-	-	تخمیر:	-	-	-	-	-
تحرک	+	+	+	+	+	سوکروز	+	+	+	+	-
رنگدانه فلورسنت	-	-	-	-	-	لاکتوز	-	-	-	-	-
اکسیداسیون-احیا	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	گلوکز	+/+	+/+	+/+	+/+	+
اکسیداز	+	+	+	+	+	آرابینوز	+	+	+	+	-
متیل رد	-	-	-	-	-	مانیتول	-	-	-	-	+
کاتالاز	+	+	+	+	+	گالاکتوز	+	+	+	+	-
تولید اندول	-	-	-	-	-	ریبوز	-	-	-	-	+
تولید سولفیدروژن	-	-	-	-	-	زایلوز	-	-	-	-	-
اوره آز	-	-	-	-	-	رامنوز	-	-	-	-	-
احیای نیترات	+	+	+	+	+	مانوز	+	+	+	+	-
وژس- پروسکوئر	-	-	-	-	-	رشد در (°C)	-	-	-	-	-
تست ONPG	-	-	-	-	-	۴	-	-	-	-	-
تجزیه ژلاتین	+	+	+	+	+	۲۰	+	+	+	+	+
مصرف سیترات	+	+	+	+	+	۳۰	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	۴۰	+	+	+	+	+



شکل-۱. الکتروفورز ژن 16S rRNA تکثیر شده از سویه‌های منتخب سودوموناس



شکل-۲. درخت فیلوژنتیک ایزوله‌های سودوموناس شاخص بر اساس روش Neighbour joining. اعداد نشان داده شده در کنار گره‌ها بیانگر میزان Bootstrap است. نوار مقیاس بیانگر جایگزینی ۵ نوکلئوتید در ۱۰۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. *S. cavourensis* به عنوان out-group در نظر گرفته شده است.

بحث

امروزه یکی از بحران‌های جدی جامعه بشری سیر صعودی مقاومت عوامل عفونی از جمله باکتریها به آنتی بیوتیک‌های رایج می‌باشد. مقابله با این بحران جهانی مستلزم بکارگیری استراتژی جامعی می‌باشد که پایش میزان حساسیت باکتری‌های بیمارها و عامل عفونت بخشی از این راهبرد تلفیقی است (۱۷). در مطالعه حاضر با توجه به پتانسیل بالای بروز مقاومت در بین گونه‌های *سودوموناس* به‌ویژه *سودوموناس آئروژینوزا* این گونه جهت بررسی انتخاب شد. با توجه به تنوع ژنتیکی این باکتری و سازگاری آن با میزبان‌ها و محیط‌های مختلف الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوتی در مناطق جغرافیایی و جمعیتی ایجاد می‌شود. به همین دلیل لزوم پایش مقاومت آنتی بیوتیکی در هر منطقه به منظور انتخاب و اولویت بندی تجویز آنتی بیوتیک و راهکارهای درمان عفونت اجتناب ناپذیر است. بروز رسانی تعیین الگوی درمانی مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در بندرعباس به عنوان یکی از مهمترین مراکز استقرار نیروهای دریایی جمهوری اسلامی ایران با بافت جمعیتی و فلور میکروبی متغیر، متأثر از اثرات اقلیمی و جغرافیایی حائز اهمیت می‌باشد. تفاوت این الگو در ادامه به تفصیل مورد بحث قرار گرفته است.

کاربرد این الگوی درمانی در صورت وقوع سوختگی‌های ناشی از حوادث مختلف از جمله صنایع دریایی نظامی قابل استفاده می‌باشد. علیرغم آنکه اغلب مطالعات بالینی بررسی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در سطح بیمارستان‌ها بر اساس روش‌های فنوتیپی انجام می‌شود اما مطالعات متعدد نشان داده‌اند روش‌های فنوتیپی معیار دقیقی برای شناسایی دقیق باکتری‌های بیمارها نمی‌باشند. از این رو در مطالعه حاضر برای شناسایی دقیق باکتری‌های بیمارها با توجه به اهمیت شناسایی دقیق آنها در تحقیقات درمانی و اپیدمیولوژیک از روش شناسایی بر اساس توالی تکاملی حفاظت شده *16S rRNA* استفاده شد. این روش به ویژه برای شناسایی ایزوله‌های غیر تیپیک بسیار کارا می‌باشد (۱۸، ۱۹). نتایج تحقیق حاضر حضور نسبتاً غالب (۷۳٪) نمونه‌های *سودوموناس* در نمونه‌های زخم نسبت به پوست ثبت شد. سایر مطالعات نیز حضور غالب گونه‌های *سودوموناس* را در زخم نسبت به پوست تایید می‌کنند. با توجه به فلور طبیعی پوست که عمدتاً از گونه‌های *استافیلوکوکوس* تشکیل شده است همچنین دلیل سدهای دفاعی و ترشحات موجود در پوست رشد گونه‌های *سودوموناس* در سطح پوست محدود شده در صورتی که در نمونه‌های زخم دلیل عدم

وجود موانع دفاعی فیزیکی و شیمیایی یعنی از بین رفتن لایه‌های پوست بدلیل سوختگی و نبودن ترشحات و چربی‌های ضد میکروبی تولید شده توسط سلول‌های پوستی و فلور طبیعی پوست امکان رشد گونه‌های *سودوموناس* ایجاد شده است. بنابراین نتیجه بدست آمده در این مطالعه با پیشینه مطالعات منطبق بود (۲۰). نتایج الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در مطالعه حاضر نشان داد ایزوله‌های *سودوموناس* جدا شده از نمونه زخم در مقابل آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۸۰٪ و ایزوله‌های بدست آمده از نمونه پوست ۴۶/۱۵٪ مقاومت نشان دادند. این درحالی است که نتایج مطالعه رجب‌پور و همکاران نشان داد که میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در میان سویه‌های *سودوموناس* ۵۸٪ بود (۲۱). همچنین در فرانسه مقاومت به این آنتی بیوتیک ۹٪، زیمبابوه ۶۱٪، روسیه ۹۱/۷٪، کانادا ۱۸٪، آمریکا ۲۰/۷٪ و در اسپانیا ۲۳٪ گزارش شد (۲۲، ۲۳). همچنین ایمانی و همکاران مقاومت به این آنتی بیوتیک را در اردبیل ۲۰/۹٪ نشان دادند (۲۴). اما مطالعه شاهچراغی و همکاران (۲۵) در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری تهران درصد مقاومت سویه‌های *سودوموناس* به این آنتی بیوتیک را نزدیک به میزان مقاومت در مطالعه حاضر معادل ۸۶/۷٪ نشان دادند. در مطالعه حاضر میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ایمی‌پنم در میان ایزوله‌های بدست آمده از زخم را معادل ۲۵٪ و در میان سویه‌های جدا شده از پوست ۱۵/۳۸٪ نشان داد. در حالیکه نتایج مطالعه نیکوکار در گیلان مقاومت به این آنتی بیوتیک را ۲۳/۳٪ گزارش نمود (۲۶). در مطالعه دیگری رجب‌نیا و همکاران گزارش نمودند که از ۵۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیمارستان‌های بابل ۳۶ درصد مقاوم به ایمی‌پنم بودند. فرج زاده نیز گزارش نمود از میان نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیمارستان‌های اهواز، ۵۸ درصد آنها به ایمی‌پنم مقاومت داشتند (۲۷). در مطالعه کیانپور و همکاران در اصفهان ۱۴/۸٪ ایزوله‌های *سودوموناس* به ایمی‌پنم مقاوم بودند (۲۸). همچنین مقایسه‌ای بین مقاومت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* برای ایمی‌پنم در سال ۲۰۰۱ در ژاپن ۸/۳٪، در کانادا ۱۲٪، روسیه ۱۳/۴٪، فرانسه ۱۸/۵٪ و اسپانیا ۱۴٪ گزارش شده است (۲۳، ۲۹). در مطالعه دیگری مقاومت به ایمی‌پنم در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از ۴ بیمارستان تهران ۵/۴٪ ثبت شد (۳۰). در مطالعه حاضر میزان مقاومت ایزوله‌های *سودوموناس* بدست آمده از نمونه‌های زخم پیراسیلین ۸۰/۵۶٪ بود. در حالی که الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های بدست آمده از نمونه‌های پوست در مقابل

سویه‌های عامل عفونت مانند سودوموناس نسبت به این آنتی‌بیوتیک در کشور ما نسبت به برخی کشورهای در حال توسعه و توسعه نیافته پایین‌تر می‌باشد.

نتایج شناسایی فنوتیپی ایزوله‌های منتخب در مطالعه حاضر، ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تعلق این پنج ایزوله به گونه سودوموناس *آئروژینوزا* را تایید نمودند. در ادامه نتایج شناسایی ژنتیکی در مورد ایزوله‌های *S11* و *S4*، *W28*، *W5* و *W23* نتایج شناسایی فنوتیپی را تایید نمود لیکن در مورد ایزوله *W23* نتایج نشان داد این ایزوله بیشترین همولوژی را با سویه *Pseudomonas pseudoalcaligenes strain Stanier 63* دارد. لذا سویه *W23* متعلق به گونه *آئروژینوزا* نبوده و ماهیت آن توسط شناسایی ژنتیکی تایید نشد. این نتیجه بار دیگر عدم قطعیت نتایج فنوتیپی را نشان داد و بر لزوم اجرای روشهای شناسایی ژنتیکی سویه‌های بیمارها تاکید مجددی داشت. سایر مطالعات نیز این گزاره را تایید می‌نمایند. برای نمونه مطالعه رجب پور نیز بر لزوم شناسایی سویه‌های سودوموناس برای شناسایی دقیق آنها تاکید داشت. آنالیز فیلوژنتیک ایزوله‌های سودوموناس دارای بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی تصویر واضحی از سیر تکاملی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را فراهم نمود (۳۵).

توالی ژن *16S rRNA* به عنوان یک ژن اورتولوگ و ساعت ملکولی در مطالعه فیلوژنتیک باکتریها مورد مطالعه قرار گرفت. ترتیب توالی این ژن به میزان بالایی حفاظت شده و اطلاعات دقیقی را برای تمایز در سطح گونه و جنس فراهم می‌کند (۳۶). نتایج آنالیز فیلوژنتیک بر اساس روش *Neighbour joining* تایید نمود که علیرغم قرارگیری ایزوله‌های *S11*، *W5*، *W28* و *W23* در یک کلا و انشعاب آنها از یک جد مشترک اما میزان واگرایی تکاملی در میان این سه سویه متفاوت بود. ایزوله‌های *S11* و *W23* از نرخ واگرایی سریعتری نسبت به دو سویه دیگر برخوردار است. این نرخ بالاتر واگرایی می‌تواند بدلیل تفاوت میزان جهش و تنگناهای ژنتیکی در نتیجه فشارهای انتخابی بر روی ژن *16S rRNA* باشد. در مجموع ایزوله‌های جداشده از نمونه‌های زخم و پوست علاوه بر تفاوت الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی از لحاظ تکاملی در ژن *16S rRNA* واگرایی نشان دادند.

نتیجه گیری

مسئله مهم در این مطالعه مقاومت بالای ایزوله‌های سودوموناس *آئروژینوزا* نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده

این آنتی بیوتیک ۴۶/۱۵٪ ثبت شد. سایر مطالعات نتایج متغیری نشان دادند برای نمونه مطالعه مالک نژاد و همکاران میزان مقاومت را ۵۵٪ گزارش نمودند (۳۱). نتایج مطالعه ما نشان داد ۲۷/۷۸٪ ایزوله‌های جدا شده از زخم به سفنازیدیم مقاومت نشان دادند. در حالیکه ۲۳/۰۸٪ از ایزوله‌های جداشده از پوست در مقابل این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. مطالعه از ۶۰۰ سویه کلینیکی سودوموناس *آئروژینوزا* جدا شده از ۴ بیمارستان تهران ۲۴/۶٪ نسبت به سفنازیدیم مقاومت نشان دادند (۳۰). در مطالعه حاضر میزان مقاومت ایزوله‌های سودوموناس جداشده از نمونه‌های زخم در مقابل آمیکاسین ۱۶/۶۷٪ گزارش شد در حالی که ۱۵/۳۸٪ ایزوله‌های بدست آمده از نمونه‌های پوست در مقابل آمیکاسین مقاومت نشان دادند. نتایج مطالعه رجب پور و همکاران نشان داد که میزان مقاومت به آمیکاسین ۱۹/۳٪ است (۲۱). مطالعه انجام شده در گیلان نشان داد ۴۸/۸٪ ایزوله‌های سودوموناس نسبت به آمیکاسین مقاومت نشان دادند (۲۶). مطالعه شاهچراغی و همکاران در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری انجام گرفت و درصد مقاومت نسبت به آمیکاسین ۹۳/۴٪، گزارش گردید که در مقایسه با مطالعه حاضر مقاومت بالاتری مشاهده می‌شود (۲۵). مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در اسپانیا ۹٪، در فرانسه ۹٪، ترکیه ۴٪ روسیه ۲۲٪، آمریکا ۱۳/۱٪ گزارش شد (۲۲، ۳۲، ۳۳). در مطالعه حاضر مقاومت به آزیترومایسن و سفپیم در میان ایزوله‌های بدست آمده از نمونه زخم به ترتیب ۳۳/۳۳٪ و ۴۱/۶۷٪ نشان داد. در حالیکه الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بدست آمده از نمونه‌های پوست در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسن ۱۵/۳۸٪ و سفپیم ۳۸/۴۶٪ ثبت گردید. در مجموع مطالعه حاضر نشان داد آنتی بیوتیک‌های ای‌می‌پنم و آمیکاسین موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان سودوموناس *آئروژینوزا* بودند و میزان مقاومت به آنها کمترین میزان بود. درحالی که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سپیروفلوکسازین و پپیراسیلین مشاهده شد. *Langaee* و همکارانش منشاء مقاومت به آنتی بیوتیک‌های دارای حلقه بتالاکتام مانند پپیراسیلین را با بیان فوق العاده آنزیم بتا لاکتاماز مرتبط اعلام نمودند (۳۴). در یک نتیجه‌گیری نهایی از نتایج این بخش از مطالعه می‌توان به این نکته تاکید نمود که با توجه به اینکه آنتی‌بیوتیک ای‌می‌پنم که در ایران جزو آنتی‌بیوتیک‌هایی است که تنها در بیمارستان‌ها تجویز می‌گردد و به سهولت در داروخانه‌ها بدون نسخه در دسترس عموم قرار نمی‌گیرد موجب گردیده میزان مصرف آن در جامعه پایین باشد و به همین دلیل میزان مقاومت

فنتوتیپی و ژنوتیپی نتایج پژوهش حاضر بر لزوم شناسایی ژنتیکی بطور مکمل با روش‌های فنتوتیپی در صورت نیاز به تشخیص دقیق تاکید می‌نماید.

تشکر و قدردانی: در اینجا لازم است از حمایت پژوهشگرده

اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان در فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی گردد.

تضاد منافع: بدینوسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که

هیچ گونه تضاد منافی درخصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع

- Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*. 2013;67(3):159-173
- Alaghebandan R, Azimi L, Lari AR. Nosocomial infections among burn patients in Teheran, Iran: a decade later. *Annals of burns and fire disasters*. 2012; 25 (1):3.
- Campa M, Bendinelli M, Friedman H, editors. *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Springer Science & Business Media; 2012.
- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP, System NNIS. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000; 21 (8):510-515.
- Fujitani S, Sun H-Y, Victor LY, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011; 139 (4):909-919.
- Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2010; 10 (4):441-451.
- Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011; 19 (8):419-426.
- Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*. 2011; 2:65.
- Lautenbach E, Synnestvedt M, Weiner MG, Bilker WB, Vo L, Schein J, et al. Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Emergence, Epidemiology, and Impact on Clinical and Economic Outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31 (1):47-53.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*. 2015;13 (1):42.
- Deschaght P, De Baets F, Vanechoutte M. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2011; 10 (5):293-297.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Laboratory exercises in microbiology*. McGraw-Hill Companies. 2002.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
- Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1989; 39 (3):224-229.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63 (8):3233-41.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;783-791
- Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharm*. 2014; 18:56-60
- Aslani MM, Sharafi Z, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Ebrahimipour G, Hashemipour M. Molecular detection and identification of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound and

- burn infections. *Pajoohandeh Journal*. 2011; 15 (6): 287-92.
19. Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41 (9):4312-17.
20. Tekin R, Dal T, Bozkurt F, Deveci Ö, Palanc Y, Arslan E, et al. Risk factors for nosocomial burn wound infection caused by multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Burn Care & Research*. 2014; 35 (1):e73-e80.
21. Rajabpour M, Arabestani M R, Yousefi mashof R, Alikhani M Y. MIC determination of *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). *Iran J Med Microbiol*. 2013; 7(3):18-25.
22. Bouza E, Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Diaz M. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 1999; 43 (4):981-982.
23. Rio Y, Pina P, Jurin F, Allouch P, Didion J, Chardon H, et al. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics isolated from patients of intensive care units in France in 1998. Resistant phenotypes to beta-lactams. *Pathologie-biologie*. 2002; 50 (1):12-17.
24. 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. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2010; 10 (3):189-198.
25. Shahcheraghi F, Feizabadi M, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (Iran). *Burns*. 2003;29(6):547-51.
26. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaeed S, Hossinpour M, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2013; 5 (1):36
27. Sheikh AF, Rostami S, Jolodar A, Tabatabaiefar MA, Khorvash F, Saki A, et al. Detection of metallo-beta lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur journal of microbiology*. 2014;7(11).
28. Kianpour F, Havaei SA, Hosseini MM. Evaluation of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Cutaneous Infections and Determination of Drug Resistance Pattern in Patients of Alzahra Hospital in Esfahan. *Journal of Isfahan Medical School*. 2010;28(110).
29. Niitsuma K, Saitoh M, Kojimabara M, Kashiwabara N, Aoki T, Tomizawa M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Fukushima Prefecture. *The Japanese journal of antibiotics*. 2001;54 (2):79-87.
30. Bagheri O, Olad G, Shahecheraghi F, Sarvari R. Solation and Identification of Strains of ImipenemResistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated in ClinicalSamples from 4 Major Hospitals of Tehran Using MIC Method. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2016; 24 (6): 159-68.
31. Sabry S, Ghozlan H, Abou-Zeid DM. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J Appl Microbiol*. 1997; 82 (2):245-52.
32. Cavallo J, Fabre R, Leblanc F, Nicolas-Chanoine M, Thabaut A. Antibiotic susceptibility and mechanisms of β -lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study (1996). *J Antimicrob Chemother*. 2000;46(1):133-36.
33. Kato K, Iwai S, Kumasaka K, Horikoshi A, Inada S, Inamatsu T, et al. Survey of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by the Tokyo Johoku Association of *Pseudomonas* Studies. *J Infect Chemother*. 2001;7 (4):258-262
34. Langae TY, Gagnon L, Huletsky A. Inactivation of the ampD Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Leads to Moderate-Basal-Level and Hyperinducible AmpC β -Lactamase Expression. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000; 44 (3):583-89.
35. Abdo Z, Minin VN, Joyce P, Sullivan J. Accounting for uncertainty in the tree topology has little effect on the decision-theoretic approach to model selection in phylogeny estimation. *Mol Biol Evol*. 2004; 22 (3):691-703
36. Sacchi S, Lorenzi S, Molla G, Pilone MS, Rossetti C, Pollegioni L. Engineering the Substrate Specificity of α -Amino-acid Oxidase. *J Biol Chem*. 2002; 277 (30):27510-16.