

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۱۳۴-۱۲۷

بررسی نقش و عملکرد آنزیم های کلبسیلا پنومونیه کارباینماز و متالوبتالاکتاماز در بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی

حامد طهماسبی (Msc)^۱، فخرالدین ملکی (Msc)^۲، ساناز ده باشی (Msc)^۳، محمدرضا عربستانی (PhD)^{۴*}

- ۱- گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
- ۲- گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران
- ۳- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- ۴- مرکز تحقیقات بروسولوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

دریافت: ۹۷/۵/۷ اصلاح: ۹۷/۱۱/۲۸ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۷

خلاصه

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی می باشد. عوامل بیماری زا در این باکتری ممکن است در بروز مقاومت های کارباینمی و بتالاکتامی نقش داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی نقش و عملکرد آنزیم های KPC و MBL در افزایش بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی، ۶۳ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از زخم سوختگی بیماران مختلف، با استفاده از تست های بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها در محیط OF، تست اکسیداز و غیره، جداسازی شد. تعیین الگوی مقاومت و سویه های متالوبتالاکتاماز و کارباینماز با روش انتشار از دیسک صورت گرفت. جهت تایید مولکولی ایزوله های جمع آوری شده، از ژن *oprD* استفاده شد. همچنین، از روش PCR جهت شناسایی ژن های عامل بیماری زایی استفاده گردید.

یافته ها: از مجموع ۶۳ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی، ۱۰ ایزوله (۱۵/۸۳٪) دارای آنزیم KPC و ۱۳ ایزوله (۲۰/۶۳٪) دارای آنزیم MBL بودند. آنتی بیوتیک های دوربین، ارتاپنم و مروپنم دارای بیشترین فراوانی بودند. همچنین، ژن *lasB* در ۴۳ ایزوله (۶۸/۲۵٪)، ژن *plcN* در ۴۱ ایزوله (۶۵/۰۷٪)، ژن *lasA* در ۲۰ ایزوله (۳۱/۷۴٪)، ژن *apr* در ۶۰ ایزوله (۹۵/۲۳٪)، ژن *phzI* در ۵۳ ایزوله (۸۴/۱۲٪)، ژن *phzII* در ۳۸ ایزوله (۶۰/۳۱٪)، ژن *phzH* در ۳۰ ایزوله (۴۷/۶۱٪) و ژن *plcH* در ۵۶ ایزوله (۸۸/۸۸٪) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تولید آنزیم های کارباینماز و متالوبتالاکتاماز سبب افزایش بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی می گردد. **واژه های کلیدی:** مقاومت آنتی بیوتیکی، سودوموناس آئروژینوزا، فاکتور بیماری زایی، آنتی بیوتیک کرباینمی.

مقدمه

ژن های فعال کننده رونویسی *lasR* و *lasI*، و سیستم *rhl* شامل ژن های *rhlI* و *rhlR* می باشد. ژن *lasI* تولید الاستاز، اگزوتوکسین A و آلکالین پروتئاز را تنظیم می کند (۴). دو نوع فسفولیپاز (PLC) توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می شود؛ فسفولیپاز با وزن مولکولی بالا که همولیتیک است (PLC-H)، در حالی که فسفولیپاز با وزن مولکولی پایین غیر همولیتیک (PLC-N) می باشد که باعث تجزیه سولفیدریل کولین می شود که موجب آزاد شدن دی آسیل گلیسرول و کولین می شود (۶). در کنار این عوامل، وجود فنیزین و پلی ساکاریدهای خارج سلولی نیز می توانند در بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا نقشی جدی داشته باشند. در این بین دو اوپرون *phzA1* و *phzA2* نقش اصلی در کنترل و تنظیم تولید فنیزین

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی می باشد و در افرادی که دچار ضعف سیستم ایمنی هستند موجب بروز بیماری های عفونی مختلف می شود (۱). در هنگام استفاده از کاتترها، آسیب دیدن بافت پوست مانند پارگی و یا سوختگی، سودوموناس آئروژینوزا به لایه های مخاطی زیرین متصل می شود و بعد از تثبیت موقعیت خود، در سایر بافت های دیگر منتشر شده و بیماری سیستمیک ایجاد می کند (۲ و ۳). یکی از مهمترین فاکتورهای بیماری زایی در سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم می باشد. آلژینات تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا عامل اصلی تولید بیوفیلم می باشد. در این باکتری، کروم سنسینگ توسط دو سیستم *las* و *rhl* کنترل می گردد (۴ و ۵). سیستم *las* شامل

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی هیئت علمی با شماره ۹۵۱۰۰۷۵۷۵۵ دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمدرضا عربستانی

بررسی الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی: تعیین حساسیت ایزوله‌های بالینی به ۵ آنتی بیوتیک مختلف شامل سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، ایمپینم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، ارتاپنم (۱۰ میکروگرم)، دورپنم (۳۰ میکروگرم) و آزترونام (۳۰ میکروگرم) (Mast، انگلستان) با استفاده از روش Kirby-Bauer Disk Diffusion انجام شد. برای به حداقل رساندن آلودگی، دیسک‌ها توسط دستگاه Disc Dispenser (Mast، انگلستان) روی سطح پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 35°C ، قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از آخرین نسخه موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

تعیین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای آنزیم KPC: جهت تعیین ایزوله‌های دارای آنزیم کابانپاماز از تست اصلاح شده هوج استفاده گردید. در این روش، براساس روش Kouhsari و همکاران تمامی مراحل انجام شد. از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان کنترل منفی و از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۶).

تعیین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای آنزیم MBL: از روش انتشار از دیسک جهت مشخص کردن سویه‌های متالوبتالاکتاماز استفاده شد. به این صورت که دیسک ایمپیم به تنهایی در مجاورت یک دیسک IMP-EDTA قرار داده شد. براساس مطالعه Panchal و همکاران، در صورتیکه قطر هاله عدم رشد دیسک IMP-EDTA نسبت به دیسک IMP بیشتر از ۷ میلی‌متر باشد، سویه MBL مثبت و اگر کمتر از ۷ میلی‌متر باشد MBL منفی در نظر گرفته می‌شود (۱۳).

استخراج ژنومی با استفاده از روش جوشاندن: جهت استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده گردید. کلیه مراحل کار با توجه به مطالعه Shahbazi و همکاران بهینه شد (۱۸).

آماده‌سازی پرایمرها و انجام PCR: پرایمرهای مورد استفاده بعد از رقیق‌سازی با غلظت ۱۰ پیکومولار برای تهیه مخلوط PCR استفاده گردید. حجم نهایی واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل: ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۲ میکرولیتر از مسترمیکس (Ampliqon آلمان) استفاده شد. برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه از ترموسایکلر BioRad C1001 (آمریکا) استفاده شد. برای تمامی ژن‌های مراحل دمایی واسرشت سازی اولیه و طولی سازی نهایی به ترتیب ۹۶ درجه سلسیوس و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه لحاظ گردید (جدول ۱).

الکتروفورز روی ژل اگارز ۱/۵ درصد: ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۱/۵ درصد در بافر $\times 0.5$ الکتروفورز گردید. از مارکر bp ۱۰۰ فرمتاز (ThermoFisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد. در این بررسی از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 و ATCC 14425 و ATCC 15692 بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج بدست آمده از تعیین مقاومت‌های آنتی بیوتیکی به روش فنوتیپی با استفاده از نرم افزار WHONet نسخه ۵/۵ مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با آزمون آماری χ^2 تجزیه و تحلیل شدند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

در این باکتری را بر عهده دارند (۷). آنزیم‌های بتالاکتامازی که مقاومت به گروه‌های مختلف بتالاکتامی را سبب می‌شود، براساس طبقه‌بندی ساختاری، به چهار گروه A تا D تقسیم می‌شوند (۸). بتالاکتام‌های گروه‌های A و C رایج‌ترین آنها می‌باشد و همانند کلاس D در جایگاه فعال خود دارای اسیدآمین سرین می‌باشد. بتالاکتام‌های کلاس B شامل متالوبتالاکتام‌ها می‌باشد و کوآنزیم آنها فلز روی است (۹). کاربائیم‌ها که در گروه A امیر جای می‌گیرند، برای درمان عفونت‌های جدی در بیمارستان‌ها بکار گرفته می‌شوند (۱۰). در مقایسه با پنی‌سلین‌ها، سفالوسپورین‌ها یا بتالاکتام‌های حاوی مهارکننده بتالاکتاماز، طیف اثر ضد میکروبی وسیعی دارند که شامل باکتری‌های گرم مثبت (مثل ایمپینم، دورپنم) و گرم منفی (مثل مروپنم، ارتاپنم) می‌باشند (۱۱ و ۱۲).

ایمی‌پنم و مروپنم فعالیت بهتری روی سودوموناس آئروژینوزا دارند. برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به ترکیبات بتالاکتام، از کربائیم‌ها (ایمیپنم-مروپنم) که نسبت به بتالاکتام‌ها مقاوم می‌باشند، استفاده می‌شود. اما، در سال‌های اخیر مقاومت به کربائیم‌ها در بسیاری از موارد گزارش شده است. این مقاومت به علت کاهش نفوذ دارو و تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده کربائیم‌ها می‌باشد. این آنزیم‌ها طیف سوبسترائی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز مونوباکتام (آزترونام) هستند (۱۳). ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها بر روی اینتگرئون‌ها قرار گرفته و می‌توانند در پلاسמיד یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سویه‌های حساس سودوموناس آئروژینوزا را نیز دارند (۱۴). در برخی مطالعات به ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا پرداخته شده است، اما این موضوع که سویه‌های دارای آنزیم کربائیم‌ها و متالوبتالاکتاماز از نظر الگوی بیماری‌زایی چه تفاوتی با یکدیگر دارند، مورد بررسی قرار نگرفته است (۱۵).

هدف از این مطالعه تعیین نقش و عملکرد آنزیم‌های کلبسیلا پنومونیه کربائیم‌ها و متالوبتالاکتاماز در افزایش بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی می‌باشد تا بتوان به الگوی مناسبی از نظر بیماری‌زایی و بروز مقاومت‌های متالوبتالاکتامازی و کربائیم‌ها در سودوموناس آئروژینوزا دست یافت.

مواد و روش‌ها

جداسازی، شناسایی و کشت باکتری‌ها: در این مطالعه مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد IR.UMSHA.REC.۱۳۹۵.۲۴۹، نمونه‌های زخم سوختگی از بیمارستان‌های منتخب شهر همدان در طی ۹ ماه از بهمن ۹۵ تا آذر ۹۶ جمع‌آوری شدند. شرایط ورود نمونه‌ها به این مطالعه، بستری بودن افراد در بخش‌های سوختگی و دارا بودن عفونت‌های پوستی شدید لحاظ گردید و عامل خروج نیز افراد فاقد عفونت سوختگی در نظر گرفته شد. روش نمونه‌گیری بصورت آسان، سریع و دردسترس و تصادفی لحاظ گردید. ایزوله‌های بدست آمده از زخم سوختگی بر روی محیط پایه بلاد آگار (Merck، آلمان) کشت داده شد و کلنی‌ها بعد از خالص‌سازی جهت تعیین جنس و گونه، بر روی محیط‌های اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا کشت داده شد. جهت تایید مولکولی ایزوله‌های جمع‌آوری شده، از ژن *oprD* استفاده گردید (۱۶).

جدول ۱. لیست پرایمرها و تنظیمات دمایی مورد استفاده جهت تکثیر ژن های عوامل بیماری‌زای سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی

منابع	تنظیمات دمایی	طول قطعات (bp)	توالی نوکلئوتیدی	ژن‌ها
(۱۹)	۱ دقیقه ۷۳°C، ۵۸°C ثانیه ۱، ۹۶°C دقیقه ۱ (۳۵)	۲۸۴	F: GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC R: TGGCGTCGACGAAACACCTCG	<i>lasB</i>
(۱۹)	۱ دقیقه ۷۳°C، ۵۷°C ثانیه ۱، ۹۶°C دقیقه ۱ (۲۵)	۱۰۷۵	F: GCAGCACAAAAGATCCCC R: GAAATGCAGGTGCGGTC	<i>lasA</i>
(۱۹)	۱ دقیقه ۷۳°C، ۵۷°C ثانیه ۵۵، ۹۶°C دقیقه ۱ (۳۵)	۶۰۸	F: GCACGTGGTCATCCTGATGC R: TCCGTAGGCGTCGACGTAC	<i>plcH</i>
(۱۹)	۱ دقیقه ۷۳°C، ۵۷°C دقیقه ۱، ۹۶°C دقیقه ۱ (۳۵)	۴۸۱	F: TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG R: TCGCTGTCGAGCAGGTGCGAAC	<i>plcN</i>
(۱۹)	۱ دقیقه ۷۳°C، ۵۹°C ثانیه ۴۵، ۹۶°C دقیقه ۱ (۲۵)	۱۰۱۷	F: TGTCCAGCAATTCTCTTGC R: CGTTTTCCACGGTGACC	<i>apr</i>
(۱۹)	۱ دقیقه ۷۳°C، ۵۶°C ثانیه ۵۰، ۹۶°C دقیقه ۱ (۲۵)	۱۰۳۶	F: GCCAAGGTTTGTGTCGG R: CGCATTGACGATATGGAAC	<i>phzII</i>
(۱۹)	۱ دقیقه ۷۳°C، ۵۸°C دقیقه ۱، ۹۶°C دقیقه ۱ (۳۵)	۳۹۲	F: CATCAGCTTAGCAATCCC R: CGGAGAACTTTTCCCTC	<i>phzI</i>
(۱۹)	۱ دقیقه ۷۳°C، ۵۹°C ثانیه ۵۰، ۹۶°C دقیقه ۱ (۲۵)	۱۷۵۲	F: GGGTTGGGTGGATTACAC R: CTCACCTGGGTGTTGAAG	<i>phzH</i>

یافته ها

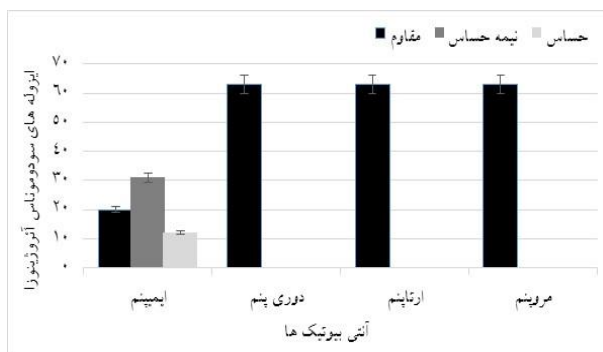
سوختگی، ۱۰ ایزوله (۱۵/۸۳٪) دارای آنزیم KPC و ۱۳ ایزوله (۲۰/۶۳٪) دارای آنزیم MBL بودند (شکل ۱و۲).

نتایج حاصل از تکثیر ژن های عوامل بیماری‌زا در ایزوله‌های سوختگی سودوموناس آئروژینوزا: الگوی پراکنش ژن های عوامل بیماری‌زا به این صورت بود که ژن *lasB* در ۴۳ ایزوله (۶۸/۲۵٪)، ژن *plcN* در ۴۱ ایزوله (۶۵/۰۷٪)، ژن *lasA* در ۲۰ ایزوله (۳۱/۷۴٪)، ژن *apr* در ۶۰ ایزوله (۹۵/۳۳٪)، ژن *phzI* در ۵۳ ایزوله (۸۴/۱۲٪)، ژن *phzII* در ۳۸ ایزوله (۶۰/۳۱٪)، ژن *phzH* در ۳۰ ایزوله (۴۷/۶۱٪) و ژن *plcH* در ۵۶ ایزوله (۸۸/۸۸٪) مشاهده گردید(نمودار ۲). نتایج آزمون نشان داد که ارتباط معنی داری بین حضور آنزیم های KPC و ژن های عامل بیماری‌زایی، آنزیم MBL و ژن های عامل بیماری‌زایی وجود دارد (جدول ۳و۳).

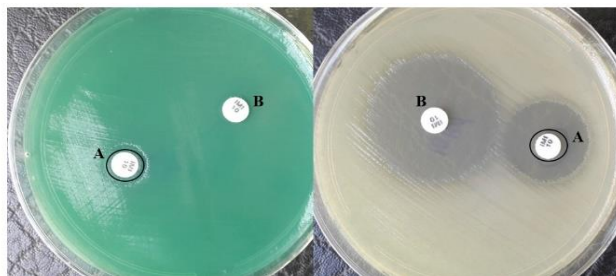
نتایج جداسازی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا از زخم سوختگی: از مجموع ۲۵۰ ایزوله مورد بررسی، ۶۳ ایزوله (۲۵/۲٪) به عنوان سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های زخم سوختگی بدست آمد.

نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی: از مجموع ۶۳ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی، سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ایمی‌پنم دارای کمترین فراوانی و سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های دوریپنم، ارتاپنم و مروپنم دارای بیشترین فراوانی بودند(نمودار ۱).

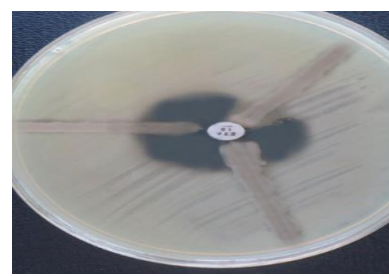
نتایج ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم دارای آنزیم‌های کارباپنماز و متالوبلاکتاماز: از مجموع ۶۳ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران



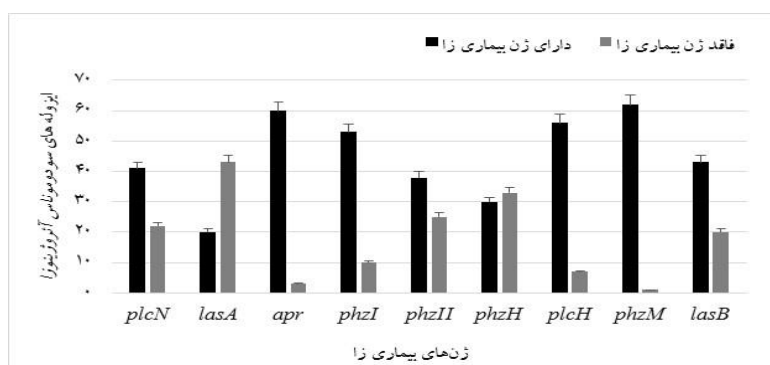
نمودار ۱. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی



شکل ۲. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای آنزیم MBL (سمت راست) و فاقد آنزیم MBL (سمت چپ). A: دیسک IMP، B: دیسک IMP+EDTA



شکل ۱. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای آنزیم KPC



نمودار ۲. فراوانی ژن‌های بیماری‌زا در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

جدول ۲. بررسی ارتباط آماری در متغیرهای مورد مطالعه در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا حامل آنزیم KPC جدا شده از زخم سوختگی

P-value	سطح	فاقد آنزیم KPC	دارای آنزیم KPC	سودوموناس آئروژینوزا متغیرها
≤ ۰/۰۰۳	A*	۱۱	۹	lasA
	B*	۴۲	۱	
≤ ۰/۰۰۱	A	۰	۱۰	lasB
	B	۵۳	۰	
≤ ۰/۰۰۸	A	۲	۸	plcH
	B	۵۱	۲	
≤ ۰/۰۰۱	A	۰	۱۰	plcN
	B	۵۳	۰	
≤ ۰/۰۰۸	A	۲	۸	apr
	B	۵۱	۲	
≤ ۰/۰۰۵	A	۱	۹	phzII
	B	۵۲	۱	
≤ ۰/۰۰۳	A	۱	۹	phzI
	B	۵۲	۱	
≤ ۰/۰۰۱	A	۰	۱۰	phzH
	B	۵۳	۰	

A: تشخیص حضور، B: عدم تشخیص حضور

جدول ۳. بررسی ارتباط آماری در متغیرهای مورد مطالعه در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا حامل آنزیم MBL جدا شده از زخم سوختگی

P-value	سطح	فاقد آنزیم MBL	دارای آنزیم MBL	سودوموناس آئروژینوزا متغیرها
≤ ۰/۰۰۷	A*	۱	۱۲	lasA
	B*	۴۹	۱	
≤ ۰/۰۰۵	A	۰	۱۳	lasB
	B	۵۰	۰	
≤ ۰/۰۰۵	A	۰	۱۳	plcH
	B	۵۰	۰	
≤ ۰/۰۰۷	A	۲	۱۱	plcN
	B	۴۸	۲	
≤ ۰/۰۰۶	A	۱۱	۳۹	apr
	B	۳	۱۰	
≤ ۰/۰۰۹	A	۲	۹	phzII
	B	۴۸	۴	
≤ ۰/۰۰۶	A	۳	۱۰	phzI
	B	۴۷	۳	
≤ ۰/۰۰۷	A	۲	۱۱	phzH
	B	۴۸	۲	

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فراوانی آنتی بیوتیک های کاربامپنی در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم سوختگی بسیار بالا، ولی سوبه های دارای آنزیم MBL و KPC بسیار کم مشاهده شد. این در حالی بود که ایزوله های مورد بررسی به بیشتر آنتی بیوتیک ها کلاس های دیگر مانند سفپودوکسیم و سفتریاکسون مقاومت ۱۰۰ درصدی داشتند. در مطالعه Akhavan-Tafti و همکاران بر روی بررسی فراوانی آنزیم های متالوبتالاکتاماز در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* از زخم های سوختگی ۲۹/۵ درصد دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند (۲۰).

در مطالعه Golshani و همکاران نشان داده شد که ۱۸ درصد ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* حامل MBL بودند (۲۱). در مطالعه Malek Mohamad و همکاران نیز مشخص شد که بیشترین فراوانی مربوط به آنتی بیوتیک مروپنیم می باشد. همچنین Khorvash و همکاران نیز نشان دادند که در ایزوله های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* بیش از ۶۰ درصد از ایزوله های به آنتی بیوتیک های کرباپنم مقاومت کامل داشتند (۲۳ و ۲۴). در مطالعات Sobouti و همکاران و Liakopoulos و همکاران فراوانی سوبه های *سودوموناس آئروژینوزا* تولید کننده KPC و MBL بیشتر از مطالعه ما گزارش شد (۲۵ و ۲۴). این عدم همخوانی را می توان به محدود بودن مطالعه حاضر در حجم نمونه اشاره کرد. زیرا یکی از عیوب مطالعات توصیفی - مقطعی و غیر اپیدمیولوژیک، محدود بودن نمونه و زمان می باشد. با بسط دادن بازه زمانی در سال ها و فصول مختلف و گرفتن نمونه در سال های مختلف، می توان این خطا را تا حدود زیادی کاهش داد. علاوه بر این، الگوی مصرف آنتی بیوتیکی و تفاوت سوبه ها با توجه به الگوهای خاص آن منطقه، شرایطی را فراهم می آورد که باکتری ها بتوانند با سرعت بیشتری مقاومت را منتقل کنند. البته نباید نکته را از نظر دور کرد که فراوانی سوبه های MBL و KPC در *سودوموناس آئروژینوزا* در قسمت آسیا الگوی متفاوتی را دنبال می کنند. به نحوی که فراوانی این سوبه ها بسیار کم می باشد. در حالیکه بیشتر گزارشات نشان از مقاومت بالای گروه پنمی در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* دارد. بطوریکه در مطالعه Hong و همکاران مشخص شد که بالاترین مقاومت در ایزوله های *سودوموناس* در کشور های کره، چین و تایوان می باشد که مقاومت به ایمپنیم، دورپنیم و مروپنیم دارای بیشترین فراوانی بود (۲۶). در مطالعه حاضر ژن های عامل بیوفیلیم، فنیزین و لایه های لعابی خارجی دیواره سلولی دارای بیشترین فراوانی بودند. در مطالعه Tutunchi و همکاران که بر روی ایزوله های *سودوموناس* صورت گرفت مشخص شد که ۹۶/۵ درصد ایزوله ها حامل ژن *phzI* ۹۳/۸ درصد ایزوله ها حامل ژن *phzII* و ۲۷/۲ درصد ایزوله ها نیز حامل *phzH* بودند (۲۷). همچنین مطالعاتی که Meskini و همکاران و Radlinski و همکاران بر روی ایزوله های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* داشتند، نشان داد که فراوانی ژن های عامل کروم سنسینگ و بیوفیلیم نقش بسیار زیادی در بیماری زا بودن و ایجاد مقاومت به برخی آنتی بیوتیک ها را دارند که از این نظر با دو مطالعه ذکر شده کاملا همخوانی

دارد. بطوریکه در مطالعه حاضر، تمامی ژن های عامل بیماری زا دارای فراوانی بسیار بالایی بودند، به طوریکه ۱۵ درصد ایزوله های مورد مطالعه تمامی ژن های عوامل بیماری زا مورد بررسی را داشتند و دارای مقاومت ۱۰۰ درصدی به گروه پنم آنتی بیوتیکی بودند. یکی از مهم ترین مواردی که در این مطالعه بررسی شد، وجود برخی متغیرها در تغییر الگوی بیماری زا یا مقاومتی باکتری بود، یکی از مهمترین مسائلی که مطرح گردید، وجود چند باکتری در محل زخم و فعالیت این دو باکتری علیه هم می تواند بیماری زا بودن باکتری دیگر را دستخوش تغییر قرار دهد. مانند باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* که در همراهی با باکتری استافیلوکوک اورئوس در نمونه های زخم، تغییرات گسترده ای را در بیماری زا و مقاومت آنتی بیوتیکی خود اعمال می کند (۲۹ و ۲۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که بین فعالیت آنزیم های KPC و MBL و بیماری زا بودن ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم سوختگی ارتباط معنی داری وجود دارد و ممکن است حضور این آنزیم ها بیماری زا باکتری را دستخوش تغییر قرار دهند. این در حالی است که عوامل متعدد دیگری نیز در فراوانی ژن های عامل بیماری زا در *سودوموناس آئروژینوزا* دخالت دارند. Gupta و همکاران نشان دادند که حضور برخی عوامل بیماری زا از جمله بیوفیلیم، کروم سنسینگ و نقص سیستم ایمنی میزبان می تواند میزان آسیب رسانی این باکتری را بیشتر کند و همچنین باکتری را در مقابل درمان مقاوم تر کند. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان داد که ژن های تولید کننده پیل، فنازین، ژن های ایجاد کننده بیوفیلیم و لایه های لعابی در کنار برخی ژن های کنترلی مانند *apr* موید این امر بودند که تنظیم و کنترل ژن های بیماری زا با توجه به وجود یا عدم وجود برخی فاکتورهای محیطی می تواند دستخوش تغییرات زیادی قرار بگیرد که در ایزوله های جدا شده از زخم سوختگی این امر به وضوح دیده شد (۳۰). تجزیه و تحلیل حاصل از این مطالعه نشان داد که، ارتباط معنی داری بین حضور آنزیم های عامل مقاومت آنتی بیوتیکی و بیماری زا *سودوموناس آئروژینوزا* جدا سازی از زخم های سوختگی وجود دارد.

زیرا *سودوموناس آئروژینوزا* طیف وسیعی از آنزیم های بیماری زا و مقاومتی مانند کاربامپنماز و متالوبتالاکتاماز را تولید می کند و شدت بیماری زا باکتری با توجه به بافت هدف می تواند متغیر باشد و در بافت های سطحی مانند پوست، این مقاومت و بیماری زا باکتری بیشتر است. از طرفی، نتایج این مطالعه نشان داد که با بیماری زا تر شدن *سودوموناس آئروژینوزا* میزان مقاومت و فعالیت آنزیم های کاربامپنازی و متالوبتالاکتامازی نیز افزایش می یابد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان و پرسنل آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه به دلیل همکاری در این مطالعه، تقدیر و تشکر می گردد.

Role and Function of KPC and MBL Enzymes in Increasing the Pathogenicity of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Burn Wounds

H. Tahmasebi (MSc)¹, F. Maleki (MSc)², S. Dehbashi (MSc)³, M.R. Arabestani (PhD)^{*4}

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R.Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan University of Basic Azad University, Hamadan, I.R.Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran
4. Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 127-34

Received: July 29th 2018, Revised: Feb 17th 2019, Accepted: Mar 18th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main causes of hospital infections. Pathogenic factors in this bacterium may play a role in the resistance to carbapenem and beta-lactam. The purpose of this study was to evaluate the role and function of KPC and MBL enzymes in increasing the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds.

METHODS: In this cross-sectional study, 63 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wounds of different patients were isolated using biochemical tests such as fermentation of sugars in the OF medium, oxidase test, and so on. Determination of resistance pattern and strains with metallo-beta-lactamase and carbapenemase was done by disc diffusion method. The oprD gene was used for molecular confirmation of isolates. PCR method was used to detect pathogenicity genes.

FINDINGS: Out of 63 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients, 10 isolates (15.83%) had KPC enzyme and 13 isolates (20.63%) had MBL enzymes. Doripenem, Ertapenem and meropenem were the most frequent. Also, the lasB gene was observed in 43 isolates (68.25%), plcN gene in 41 isolates (65.07%), lasA gene in 20 isolates (31.74%), apr in 60 isolates (95.23%), phzI gene in 53 isolates (84.12%), the phzII gene in 38 isolates (60.31%), phzH gene in 30 isolates (47.61%) and plcH gene in 56 isolates (88.88%).

CONCLUSION: The results of this study showed that the production of Carbapenemase and MBL enzymes increased the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds.

KEY WORDS: Antibiotic Resistance, *Pseudomonas Aeruginosa*, Virulence Factors, Carbapenem Antibiotics.

Please cite this article as follows:

Tahmasebi H, Maleki F, Dehbashi S, Arabestani MR. Role and Function of KPC and MBL Enzymes in Increasing the Pathogenicity of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Burn Wounds. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:127-34.

*Corresponding Author: M.R. Arabestani (PhD)

Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

Tel: +98 81 23838077

Email: mohammad.arabestan@gmail.com

References

1. Gonzalez MR, Fleuchot B, Lauciello L, Jafari P, Applegate LA, Raffoul W, et al. Effect of Human Burn Wound Exudate on *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *mSphere*. 2016;1(2):e00111-15.
2. Lashgarian H, Marzban A, Estaji M, Gholami M, Masoumi asl H, Raheb J. Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for Typing *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Urine Samples of Different Patients. *J Babol Univ Med Sci*. 2018; 20(2):56-63
3. Tahmasebi H, Yousef Alikhani M, Dehbashi S, Arabestani MR. Investigation of the relationship between the presence of chromosomal and plasmid-encoded amp^c genes and type of clinical specimen in *pseudomonas aeruginosa*. *J Babol Univ Med Sci*. 2018; 20(3):36-43.
4. Salehi Z, Amini K, Kheirkhah B. Molecular Identification of Quorum Sensing Genes in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and Antibiotic Resistance Profile. *J Babol Univ Med Sci*. 2017; 19(4):46-53.
5. Burr LD, Rogers GB, Chen AC, Hamilton BR, Pool GF, Taylor SL, et al. Macrolide Treatment Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. An Analysis from the Bronchiectasis and Low-Dose Erythromycin Study Trial. *Ann Am Thorac Soc*. 2016; 13(10):1697-703.
6. Kouhsari E, Zahedi bialvaei A, Fakhre Yaseri H, Samadi Kafil H, Mohamadzade R, Rahbar M. A review on common laboratory methods for detection of carbapenemase Gram-negative bacilli. *Razi J Med Sci*. 2018; 24(165):47-65
7. Ertugrul BM, Oryasin E, Lipsky BA, Willke A, Bozdogan B. Virulence genes *fliC*, *toxA* and *phzS* are common among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from diabetic foot infections. *Infect Dis*. 2018;50(4):273-9.
8. Dehbashi S, Tahmasebi H, Zeyni B, Arabestani MR. The relationship between promoter-dependent quorum sensing induced genes and methicillin resistance in clinical strains of *staphylococcus aureus*. *J Zanjan Univ Med Sci Health Serv*. 2018;26(116):75-87.[In Persian]
9. Ahdi Khosroshahi S, Farajnia S, Azhari F, Hosseini MK, Khanipour F, Farajnia H, et al. Antimicrobial Susceptibility Pattern and Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase Genotypes among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, North-West of Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2017;10(6):e13368.
10. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. High resolution melting curve analysis method for detecting of carbapenemases producing *pseudomonas aeruginosa*. *J Krishna Instit Med Sci Univ*. 2018;7(4):70-7.
11. Ding Y, Teo J, Drautz-Moses DI, Schuster SC, Givskov M, Yang L. The Acquisition of Resistance to Carbapenem and Macrolide-mediated Quorum Sensing Inhibition by *Pseudomonas aeruginosa* via a Novel Integrative and Conjugative Element ICETn43716385. *bioRxiv*. 2017:161497.
12. Sah S, Hemalatha S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mechanism of antibiotic resistance and epidemiology. *Int J PharmTech Res*. 2015; 7(2):303-9.
13. Panchal CA, Oza SS, Mehta SJ. Comparison of four phenotypic methods for detection of metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria in rural teaching hospital. *J Lab Physicians*. 2017;9(2):81-3.
14. Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of *bla-VIM* gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). *Iran J Med Microbiol*. 2010;3(4):1-8.[In Persian]
15. Hwang S, Kim CY, Ji S-G, Go J, Kim H, Yang S, et al. Network-assisted investigation of virulence and antibiotic-resistance systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2016;6:26223.
16. Connie M, Lehman D, Manuselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. St. Louis: Saunders; 2014.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute (M100-S22). 2012; 32(22). Available from: http://zums.ac.ir/files/health/pages/ill/azmayeshghah/clsi_2013.pdf
18. Shahbazi B, Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. *Zanko J Med Sci*. 2014;15(45):9-16.[In Persian]
19. 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.

20. Akhavan-Tafti F, Eslami G, Zandi H, Mousavi SM, Zarei M. Prevalence of blaVIM, blaIPM and blaNDM Metallo-Beta-Lactamases Enzymes in Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Wounds in Shahid Sadoughi Burn Hospital, Yazd, Iran. *J Isfahan Med Sch.* 2014; 31(263):10.
21. Golshani Z, Ahadi AM, Sharifzadeh A. Occurrence of ambler class b metallo-β-lactamase gene in imipenem-resistant pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples. *Zahedan J Res Med Sci.* 2014;16(2):6-9. [In Persian]
22. Malek Mohammad S, Rostami S, Zamanzad B, Gholipour A, Drees F. Detection of exotoxins and antimicrobial susceptibility pattern in clinical pseudomonas aeruginosa isolates. *Avicenna J Clin Microb Infec.* In Press(In Press):e44802.
23. Khorvash F, Yazdani M, Shabani S, Soudi A. Pseudomonas aeruginosa-producing Metallo-β-lactamases (VIM, IMP, SME, and AIM) in the clinical isolates of intensive care units, a university hospital in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res.* 2017;6:147.
24. Sobouti B, Khosravi N, Daneshvar A, Fallah S, Moradi M, Ghavami Y. Prevalence of beta lactamase producing species of pseudomonas and acinetobacter in pediatric burn patients. *Ann Burns Fire Disasters.* 2015;28(3):171-7.
25. Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, et al. Carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):505.
26. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo-β-Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa. *Infect Chemother.* 2015;47(2):81-97.
27. Tutunchi F, Zeighami H. Detection of phenazine genes in multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa isolates. *Pathobiol Res.* 2016;19(1):1-11.
28. Radlinski L, Rowe SE, Kartchner LB, Maile R, Cairns BA, Vitko NP, et al. Pseudomonas aeruginosa exoproducts determine antibiotic efficacy against Staphylococcus aureus. *PLoS Biol.* 2017;15(11):e2003981.
29. Meskini M, Esmaeili D. The study of formulated Zoush ointment against wound infection and gene expression of virulence factors Pseudomonas aeruginosa. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):185.
30. Gupta P, Gupta RK, Harjai K. Multiple virulence factors regulated by quorum sensing may help in establishment and colonisation of urinary tract by Pseudomonas aeruginosa during experimental urinary tract infection. *Indian J Med Microbiol.* 2013;31(1):29-33.