

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

حامد طهماسبی (Msc)<sup>۱</sup>، فخرالدین ملکی (Msc)<sup>۲</sup>، ساناز ده باشی (Msc)<sup>۳</sup>، محمدرضا عربستانی (PhD)<sup>۴\*</sup>

- ۱- گروه میکروشناسی، 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 کارباپنمی 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 بیماراران 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 کارباپنماز 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 بیماراران سوختگی، ۱۰ ایزوله (۱۵/۸۳٪) دارای آنزیم KPC و ۱۳ ایزوله (۲۰/۶۳٪) دارای آنزیم MBL بودند. آنتی بیوتیک های دوریپنم، 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 کارباپنماز 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 کرباپنمی.

### مقدمه

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. آلزینات 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

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 آکالین 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

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

\* مسئول مقاله: دکتر محمدرضا عربستانی

آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروشناسی. تلفن: ۰۸۱-۲۳۸۳۸۰۷۷

E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

**بررسی الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی:** تعیین حساسیت ایزوله های بالینی به ۵ آنتی بیوتیک مختلف شامل سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، ایمپنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، ارتاپنم (۱۰ میکروگرم)، دوریپنم (۳۰ میکروگرم) و آرترونام (۳۰ میکروگرم) (Mast، انگلستان) با استفاده از روش Kirby-Bauer Disk Diffusion انجام شد. برای به حداقل رساندن آلودگی، دیسک ها توسط دستگاه Disc Dispenser (Mast، انگلستان) روی سطح پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای  $35^{\circ}\text{C}$ ، قطر هاله های عدم رشد با استفاده از آخرین نسخه موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

**تعیین سویه های سودوموناس آئروژینوزای دارای آنزیم KPC:** جهت تعیین ایزوله های دارای آنزیم کاباپنماز 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 سویه های سودوموناس آئروژینوزای دارای آنزیم MBL:** از روش انتشار از دیسک جهت مشخص کردن سویه های متالوبتالاکتاماز استفاده شد. به این صورت که دیسک ایمپنم 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 میلی میتر باشد، سویه MBL مثبت و اگر کمتر از ۷ میلی متر باشد MBL منفی در نظر گرفته می شود (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).

**آماده سازی پرایمر ها و انجام PCR:** پرایمرهای مورد استفاده بعد از رقیق سازی 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 ژن های مورد مطالعه از ترموسایکلر BioRad C1001 (آمریکا) استفاده شد. برای تمامی ژن های 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  $\times 5$  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 14425 و ATCC بعنوان کنترل مثبت و از سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC 15692 بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

**تجزیه و تحلیل داده ها:** نتایج بدست آمده از تعیین مقاومت های آنتی بیوتیکی به روش فنوتیپی با استفاده از نرم افزار WHONet نسخه ۵/۵ مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با آزمون آماری  $\chi^2$  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 گروه های مختلف بتالاکتامی را سبب می شود، براساس طبقه بندی ساختاری، به چهار گروه A تا D تقسیم می شوند (۸). بتالاکتامازهای گروه های A و C رایج ترین آنها می باشد و همانند کلاس D در جایگاه فعال خود دارای اسید آمینه سرین می باشد. بتالاکتامازهای کلاس B شامل متالوبتالاکتامازها می باشد و کوآنزیم آنها فلز روی است (۹). کارباینمها که در گروه A امبر جای می گیرند، برای درمان عفونت های جدی در بیمارستان ها بکار گرفته می شوند (۱۰). در مقایسه با پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها یا بتالاکتام های حاوی مهارکننده بتالاکتاماز، طیف اثر ضد میکروبی وسیعی دارند که شامل باکتری های گرم مثبت (مثل ایمپنم، دوریپنم) و گرم منفی (مثل مروپنم، ارتاپنم) می باشند (۱۱ و ۱۲).

ایمپنم و مروپنم فعالیت بهتری روی سودوموناس آئروژینوزا دارند. برای درمان عفونت های ناشی از سویه های مقاوم به ترکیبات بتالاکتام، از کرباینمها (ایمپنم-مروپنم) که نسبت به بتالاکتامها مقاوم می باشند، استفاده می شود. اما، در سال های اخیر مقاومت به کرباینمها در بسیاری از موارد گزارش شده است. این مقاومت به علت کاهش نفوذ دارو و تولید آنزیم های هیدرولیزکننده کرباینمها می باشد. این آنزیمها طیف سوپستراتی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتامها به جز مونوباکتام (آرترونام) هستند (۱۳). ژن های کد کننده این آنزیمها بر روی اینتگرون ها قرار گرفته و می توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سویه های حساس سودوموناس آئروژینوزا را نیز دارند (۱۴). در برخی مطالعات به ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور عوامل بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا پرداخته شده است، اما این موضوع که سویه های دارای آنزیم کرباینماز و متالوبتالاکتاماز از نظر الگوی بیماری زایی چه تفاوتی با یکدیگر دارند، مورد بررسی قرار نگرفته است (۱۵).

هدف از این مطالعه تعیین نقش و عملکرد آنزیمهای کلبسیلا پنومونیه کرباینماز و متالوبتالاکتاماز در افزایش بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی می باشد تا بتوان به الگوی مناسبی از نظر بیماری زایی و بروز مقاومت های متالوبتالاکتامازی و کرباینمازی در سودوموناس آئروژینوزا دست یافت.

## مواد و روش ها

**جداسازی، شناسایی و کشت باکتری ها:** در این مطالعه مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد IR.UMSHA.REC.۱۳۹۵.۲۴۹، نمونه های زخم سوختگی از بیمارستان های منتخب شهر همدان در طی ۹ ماه از بهمن ۹۵ تا آذر ۹۶ جمع آوری شدند. شرایط ورود نمونه ها به این مطالعه، بستری بودن افراد در بخش های سوختگی و دارا بودن عفونت های پوستی شدید لحاظ گردید و عامل خروج نیز افراد فاقد عفونت سوختگی در نظر گرفته شد. روش نمونه گیری بصورت آسان، سریع و دردسترس و تصادفی لحاظ گردید. ایزوله های بدست آمده از زخم سوختگی بر روی محیط پایه بلاد آگار (Merck، آلمان) کشت داده شد و کلنی ها بعد از خالص سازی جهت تعیین جنس و گونه، بر روی محیط های اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا کشت داده شد. جهت تایید مولکولی ایزوله های جمع آوری شده، از ژن *oprD* استفاده گردید (۱۶).

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

| ژن ها        | توالی نوکلئوتیدی                                        | طول قطعات (bp) | تنظیمات دمایی                                     | منابع |
|--------------|---------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------------|-------|
| <i>lasB</i>  | F: GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC<br>R: TGGCGTCGACGAACACCTCG  | ۲۸۴            | ۳۵ (۱ دقیقه °C ۹۶، ۵۰ ثانیه °C ۵۸، ۱ دقیقه °C ۷۲) | (۱۹)  |
| <i>lasA</i>  | F: GCAGCACAAAAGATCCC<br>R: GAAATGCAGGTGCGGTC            | ۱۰۷۵           | ۲۵ (۱ دقیقه °C ۹۶، ۵۰ ثانیه °C ۵۷، ۱ دقیقه °C ۷۲) | (۱۹)  |
| <i>plcH</i>  | F: GCACGTGGTCATCCTGATGC<br>R: TCCGTAGGCGTCGACGTAC       | ۶۰۸            | ۳۵ (۱ دقیقه °C ۹۶، ۵۵ ثانیه °C ۵۷، ۱ دقیقه °C ۷۲) | (۱۹)  |
| <i>plcN</i>  | F: TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG<br>R: TCGCTGTCGAGCAGGTGCAAC | ۴۸۱            | ۳۵ (۱ دقیقه °C ۹۶، ۱ دقیقه °C ۵۷، ۱ دقیقه °C ۷۲)  | (۱۹)  |
| <i>apr</i>   | F: TGTCCAGCAATTCTCTTGC<br>R: CGTTTTCCACGGTGACC          | ۱۰۱۷           | ۲۵ (۱ دقیقه °C ۹۶، ۴۵ ثانیه °C ۵۹، ۱ دقیقه °C ۷۲) | (۱۹)  |
| <i>phzII</i> | F: GCCAAGGTTTGTGTCGG<br>R: CGCATTGACGATATGGAAC          | ۱۰۳۶           | ۲۵ (۱ دقیقه °C ۹۶، ۵۰ ثانیه °C ۵۶، ۱ دقیقه °C ۷۲) | (۱۹)  |
| <i>phzI</i>  | F: CATCAGCTTAGCAATCCC<br>R: CGGAGAAACTTTTCCCTC          | ۳۹۲            | ۳۵ (۱ دقیقه °C ۹۶، ۱ دقیقه °C ۵۸، ۱ دقیقه °C ۷۲)  | (۱۹)  |
| <i>phzH</i>  | F: GGGTTGGGTGGATTACAC<br>R: CTCACCTGGGTGTTGAAG          | ۱۷۵۲           | ۲۵ (۱ دقیقه °C ۹۶، ۵۰ ثانیه °C ۵۹، ۱ دقیقه °C ۷۲) | (۱۹)  |

## یافته ها

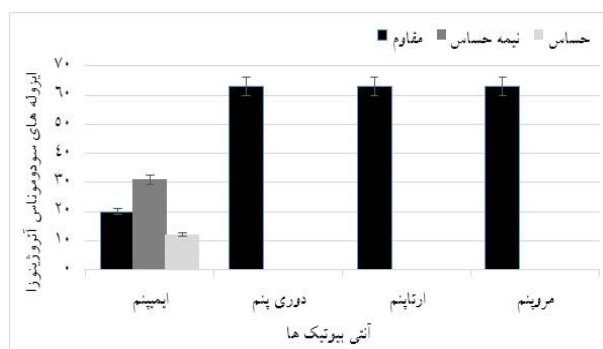
سوختگی، ۱۰ ایزوله (۱۵/۸۳٪) دارای آنزیم KPC و ۱۳ ایزوله (۲۰/۶۳٪) دارای آنزیم MBL بودند (شکل ۱ و ۲).

نتایج حاصل از تکثیر ژن های عوامل بیماری زا در ایزوله های سوختگی سودوموناس آئروژینوزا: الگوی پراکنش ژن های عوامل بیماری زا 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 بیماری زایی، آنزیم MBL و ژن های عامل بیماری زایی وجود دارد (جدول ۲ و ۳).

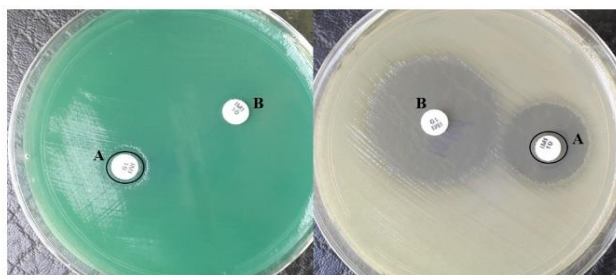
نتایج جداسازی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا از زخم سوختگی: از مجموع ۲۵۰ ایزوله مورد بررسی، ۶۳ ایزوله (۲۵/۲٪) به عنوان سودوموناس آئروژینوزا از نمونه های زخم سوختگی بدست آمد.

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

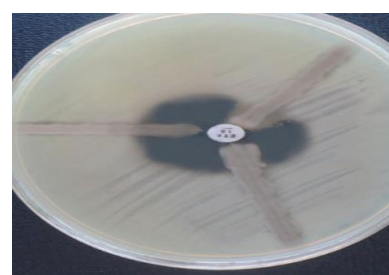
نتایج ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم دارای آنزیم های کاربپنماز و متالوبتالاکتاماز: از مجموع ۶۳ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران



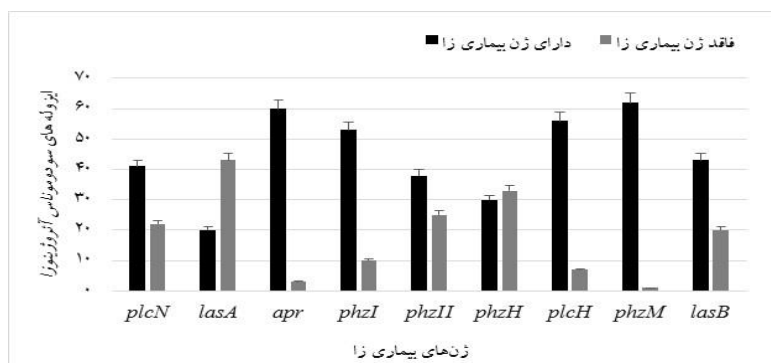
نمودار ۱. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی



شکل ۲. سویه های سودوموناس آئروژینوزا دارای آنزیم MBL (سمت راست) و فاقد آنزیم MBL (سمت چپ). A: دیسک IMP. B: دیسک IMP+EDTA



شکل ۱. سویه های سودوموناس آئروژینوزا 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

| متغیرها      | سودوموناس آئروژینوزا | دارای آنزیم KPC | فاقد آنزیم KPC | سطح | P-value      |
|--------------|----------------------|-----------------|----------------|-----|--------------|
| <i>lasA</i>  |                      | ۹               | ۱۱             | A*  | $\leq 0.003$ |
|              |                      | ۱               | ۴۲             | B*  |              |
| <i>lasB</i>  |                      | ۱۰              | ۰              | A   | $\leq 0.001$ |
|              |                      | ۰               | ۵۳             | B   |              |
| <i>plcH</i>  |                      | ۸               | ۲              | A   | $\leq 0.008$ |
|              |                      | ۲               | ۵۱             | B   |              |
| <i>plcN</i>  |                      | ۱۰              | ۰              | A   | $\leq 0.001$ |
|              |                      | ۰               | ۵۳             | B   |              |
| <i>apr</i>   |                      | ۸               | ۲              | A   | $\leq 0.008$ |
|              |                      | ۲               | ۵۱             | B   |              |
| <i>phzII</i> |                      | ۹               | ۱              | A   | $\leq 0.005$ |
|              |                      | ۱               | ۵۲             | B   |              |
| <i>phzI</i>  |                      | ۹               | ۱              | A   | $\leq 0.003$ |
|              |                      | ۱               | ۵۲             | B   |              |
| <i>phzH</i>  |                      | ۱۰              | ۰              | A   | $\leq 0.001$ |
|              |                      | ۰               | ۵۳             | B   |              |

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

| متغیرها      | سودوموناس آئروژینوزا | دارای آنزیم MBL | فاقد آنزیم MBL | سطح | P-value      |
|--------------|----------------------|-----------------|----------------|-----|--------------|
| <i>lasA</i>  |                      | ۱۲              | ۱              | A*  | $\leq 0.007$ |
|              |                      | ۱               | ۴۹             | B*  |              |
| <i>lasB</i>  |                      | ۱۳              | ۰              | A   | $\leq 0.005$ |
|              |                      | ۰               | ۵۰             | B   |              |
| <i>plcH</i>  |                      | ۱۳              | ۰              | A   | $\leq 0.005$ |
|              |                      | ۰               | ۵۰             | B   |              |
| <i>plcN</i>  |                      | ۱۱              | ۲              | A   | $\leq 0.007$ |
|              |                      | ۲               | ۴۸             | B   |              |
| <i>apr</i>   |                      | ۳۹              | ۱۱             | A   | $\leq 0.006$ |
|              |                      | ۱۰              | ۳              | B   |              |
| <i>phzII</i> |                      | ۹               | ۲              | A   | $\leq 0.009$ |
|              |                      | ۴               | ۴۸             | B   |              |
| <i>phzI</i>  |                      | ۱۰              | ۳              | A   | $\leq 0.006$ |
|              |                      | ۳               | ۴۷             | B   |              |
| <i>phzH</i>  |                      | ۱۱              | ۲              | A   | $\leq 0.007$ |
|              |                      | ۲               | ۴۸             | B   |              |

## 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 سویه 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 کربامپن مقاومت کامل داشتند (۲۳ و ۲۲). در مطالعات Sobouti و همکاران و Liakopoulos و همکاران فراوانی سویه 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 سویه ها با توجه به الگوی های خاص آن منطقه، شرایطی را فراهم می آورد که باکتری ها بتوانند با سرعت بیشتری مقاومت را منتقل کنند. البته نباید این نکته را از نظر دور کرد که فراوانی سویه های MBL و KPC در *سودوموناس آئروژینوزا* در قسمت آسیا الگوی متفاوتی را دنبال می کنند. به نحوی که فراوانی این سویه ها بسیار کم می باشد. در حالیکه بیشتر گزارشات نشان از مقاومت بالای گروه پنیی 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، فنینزین 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* و 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 کاملاً 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، فنانزین، 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 و 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 کاربامپناز 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 میکروب 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)<sup>1</sup>, F. Maleki (MSc)<sup>2</sup>, S. Dehbashi (MSc)<sup>3</sup>, M.R. Arabestani (PhD)<sup>\*4</sup>

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 29<sup>th</sup> 2018, Revised: Feb 17<sup>th</sup> 2019, Accepted: Mar 18<sup>th</sup> 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 ampc 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  $\beta$ -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- $\beta$ -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. 5<sup>th</sup> 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](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- $\beta$ -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 Mohamad 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- $\beta$ -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- $\beta$ -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.