Archive of SID
ارتباط ژن estA با تشکیل بیوفیلم

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 14:16 +0330 on Tuesday January 21st 2020

مقاله پژوهشی

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباط ژن *استراز (estA)* با تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران سوختگی

پریسا روشنی اصل[۱]، نیلوفر رشیدی[۲*]، لیلی شکوهی زاده[۳]، الهه تاجبخش[۱]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا، به‌عنوان یک عامل عمده عفونت‌های بیمارستانی شناخته‌شده است. تشکیل بیوفیلم، عامل بیماری‌زای مهمی در عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* است. این پاتوژن در طی تشکیل بیوفیلم، هیدرولازهای خارج سلولی ازجمله استراز estA تولید می‌کند که می‌تواند تشکیل و ساختار بیوفیلم را تحت تأثیر قرار دهد. هدف از این مطالعه ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع ژن *estA* در میان سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تولیدکننده بیوفیلم جداشده از بیماران سوختگی است.

مواد و روش‌ها: درمجموع، ۳۷ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران سوختگی در بیمارستان طالقانی شهرستان اهواز با استفاده از روش‌های باکتریولوژی استاندارد شناسایی و جدا شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک مطابق با استاندارد توصیه‌شده توسط CLSI 2015 تعیین گردید. تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت اندازه‌گیری شد. حضور ژن *estA* با روش PCR بررسی گردید.

نتایج: ژن *estA* در ۹۷/۳٪ از سویه‌ها وجود داشت و ۷۸/۳٪ از سویه‌ها تولیدکننده بیوفیلم بودند. بر اساس نتایج تست آنتی بیوگرام بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین/ تازوباکتام (۹۲٪) و کمترین مقاومت به کلیستین (۸٪) بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن *estA* و تشکیل بیوفیلم وجود نداشت. میزان بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سودوموناس آئروژینوزا* قابل‌توجه است.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، *estA*، بیوفیلم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی، متعلق به خانواده سودوموناسه، هوازی اجباری، غیر تخمیری و ساپروفیت است (۱، ۲). این باکتری، به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب دومین باکتری شایع عامل عفونت‌های بیمارستانی است و به‌مراتب از جریان خون، عفونت‌های زخم، ذات‌الریه، عفونت‌های ادراری و داخل شکمی جداشده است. همچنین، یک مشکل جدی در بیماران نقص ایمنی مبتلابه فیبروز کیستی، سرطان، ایدز و سوختگی‌های شدید محسوب می‌شود (۳، ۴). در سال‌های اخیر، عفونت‌های بیمارستانی ایجادشده توسط *سودوموناس آئروژینوزا*، به دلیل مقاومت ذاتی آن‌ها به بسیاری از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و ظرفیت آن‌ها برای کسب مقاومت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر، به‌عنوان یک مشکل حاد در بیمارستان‌ها شناخته‌شده‌اند (۵). تولید بیوفیلم به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم در عفونت‌های

*نویسنده مسئول: **نیلوفر رشیدی**، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
Email: ni.rashidi@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-6439-7498

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 14:16 +0330 on Tuesday January 21st 2020

سودوموناس آئروژینوزا در نظر گرفته‌شده است (۶). بیوفیلم‌ها تجمعات سازمان‌یافته باکتری‌ها هستند که به یکدیگر و به یک سطح متصل شده‌اند و درون یک پلیمر خارج سلولی قرارگرفته‌اند. پلیمر خارج سلولی می‌تواند شامل پلی ساکاریدها، نوکلئیک اسیدها، لیپیدها و پروتئین‌ها باشد که به‌وسیله نیروهای مکانیکی مقاوم، به جمعیت باکتری‌ها استحکام فیزیکی و شیمیایی می‌بخشد و نفوذ مواد سمی را کاهش می‌دهد. مقاومت بیوفیلم‌های باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد میکروبی، باعث انعطاف‌پذیری فوق‌العاده آن‌ها می‌شود (۷-۱۰). برخی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در طی تشکیل بیوفیلم، هیدرولازهای خارج سلولی از قبیل استراز estA تولید می‌کنند که به‌عنوان یک فاکتور بیماری‌زا به‌خوبی شناخته‌شده و جزو آنزیم‌های لیپولیتیک است. استراز estA با ایجاد تغییراتی در ترکیب و خصوصیات مواد پلیمریک خارج سلولی و همچنین حرکت سلول‌ها، به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم بر تشکیل و ساختار بیوفیلم‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تأثیر می‌گذارد (۱۱). علیرغم شیوع بالای عفونت‌های ناشی از این باکتری در بیماران دارای سوختگی و نیز مشکلات مربوط به درمان آن‌ها، اطلاعات کمی در مورد توزیع فاکتورهای بیماری‌زا و توانایی تولید بیوفیلم در میان سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* وجود دارد. لذا این مطالعه باهدف بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در حضور ژن *estA* در سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در بیمارستان سوختگی طالقانی شهرستان اهواز انجام‌شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، تعداد ۵۰ نمونه بالینی مختلف شامل نمونه زخم، ادرار و خون با مراجعه به بیمارستان سوانح و سوختگی طالقانی شهرستان اهواز از فروردین تا تیرماه ۹۴، به‌صورت تصادفی جمع‌آوری شد. تعیین حجم نمونه با استفاده از فرمول $n = \frac{Z^2pq}{d^2}$ انجام گرفت. ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط بلاد آگار، ائوزین متیلن بلو آگار و سودوموناس ستریمید آگار کشت داده شدند و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، به‌منظور مشاهده کلونی‌های مشکوک به *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی گردیدند. نمونه‌ها با توجه به رنگ کلونی، بوی شبیه انگور، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی ازجمله واکنش اکسیداز، تخمیر قند در محیط TSI، بتاهمولیزین در محیط بلاد آگار و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد شناسایی شدند (۱۲-۱۵). حساسیت باکتری‌های جداشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ازترونام (۳۰ µg)، آزیترومایسین (۱۵ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، تیکارسیلین/کلاولانیک‌اسید (۷۵/۱۰ µg)، مروپنم، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۱۰۰/۱۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، کلیستین (۱۰µg) و کلیستین سولفات (۱۰µg) تهیه‌شده از شرکت Rosco، دانمارک، با استفاده از روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاهی بالینی CLSI 2015 انجام شد (۱۶). از سویه *سودوموناس آئروژینوزا* به شماره ATCC 27853 جهت کنترل کیفی آنتی بیوگرام استفاده گردید.

به‌منظور ارزیابی تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به روش میکروتیتر پلیت، هرکدام از سویه‌های ذخیره‌شده در محیط اسکیم میلک، به محیط بلاد آگار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. حدود ۵-۴ کلنی تک رشد کرده روی محیط بلاد آگار در ۵-۳ میلی‌لیتر محیط TSB تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. از TSB تنها نیز به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پس از انکوباسیون، کشت‌ها به نسبت ۱:۱۰۰ در TSB رقیق شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام به یک چاهک از میکروپلیت ۹۶ تایی منتقل گشته سپس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محتویات هر چاهک خارج گردید و چاهک‌ها با PBS شستشو داده شدند و به هرکدام از آن‌ها ۱۲۵ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۰/۱ درصد اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه، رنگ‌ها را خارج نموده، چاهک‌ها با آب تمیز شسته شدند و در دمای اتاق قرار داده شدند تا خشک شوند. پس‌ازآن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ اضافه گردید، سپس OD محتویات هر یک از چاهک‌ها در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد (۱۷). تست تشکیل بیوفیلم دو بار تکرار شد. میزان تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بر اساس فرمول زیر ارزیابی گردید که در آن ODC میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل است (۱۸):

قوی= OD > (۴ × ODC)، متوسط= (۴ × ODC) ≥ OD > (۲ × ODC)، ضعیف= (۲× ODC) ≥ OD > ODC و عدم تشکیل بیوفیلم= OD≤ODC.

www.SID.ir

Archive of SID
ارتباط ژن estA با تشکیل بیوفیلم

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 14:16 +0330 on Tuesday January 21st 2020

استخراج DNA ژنومی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از کیت سیناژن (سینا کلون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت (۱۵). ژنوم تخلیص شده برای بررسی حضور ژن *estA* از طریق واکنش PCR استفاده شد. به‌منظور تکثیر ژن *estA*، پرایمرهای اختصاصی مناسب این ژن با توالی نوکلئوتیدی:

F: CTATTCGACGCTGGTGGTGT و
R: AGCGGGATGTTCAACGGAAT

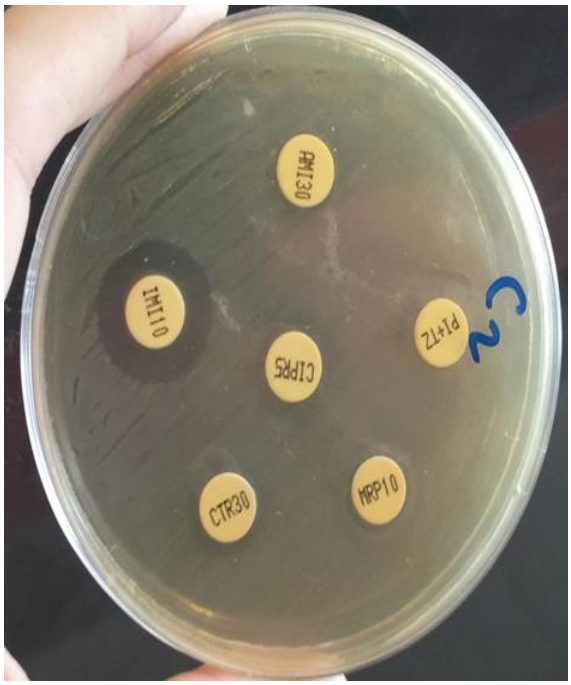
به طول ۶۹۰ جفت باز، با استفاده از نرم‌افزار طراحی پرایمر در سایت NCBI طراحی گردید. پرایمرها توسط شرکت آرین ژن گستر به‌عنوان نماینده شرکت آلمانی Metabion سنتز شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۹ میکرولیتر آب مقطر، ۴ میکرولیتر DNA استخراج‌شده، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۱۶ میکرولیتر Master Mix (شرکت آرین ژن گستر) انجام شد. در ادامه، واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر *Peq (star)* با برنامه دمایی مناسب انجام گردید. برنامه دمایی مربوط به ژن‌ها در جدول ۱ ذکرشده است. درنهایت، محصولات PCR از طریق ژل آگارز ۱/۵٪ و دستگاه الکتروفورز آنالیز و سپس توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. همچنین از مارکر bp ۱۰۰ جهت تائید وزن مولکولی محصولات تکثیرشده استفاده شد. قطعات DNA به کمک دستگاه Gel Photo Doc مشاهده و عکس باندهای موردنظر تهیه گردید.

نتایج

نتایج مربوط به کشت نمونه‌های بالینی و تست‌های میکروب‌شناسی نشان داد که از مجموع ۵۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، (٪۷۴) ۳۷ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* بودند که شامل نمونه‌های حاصل از زخم، خون و ادرار بودند. بیشترین عفونت سودوموناسی در بخش زنان (٪۵۶/۸) مشاهده گردید، همچنین فراوانی عفونت سودوموناسی در سایر بخش‌های مختلف بیمارستان شامل آی سی یو (٪۲۹/۷)، اطفال (٪۸) و مردان (٪۵/۵) تعیین گردید. بر اساس نوع نمونه بالینی در بیش از ٪۷۵ موارد *سودوموناس آئروژینوزا* از عفونت زخم‌های سوختگی جدا گردید. فراوانی *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های خون و ادرار به ترتیب ٪۲۱/۷ و ٪۲/۷ بود. میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌ها به روش انتشار دیسک کربی- بایر انجام شد (شکل ۱). در این آزمون، بیشترین مقاومت نسبت به پیپراسیلین/ تازوباکتام (٪۹۲) و کمترین مقاومت نسبت به کلیستین (٪۸) مشاهده شد.

جدول ۱- برنامه زمانی انجام PCR جهت تکثیر ژن *estA*

مرحله	حرارت (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
Initial Denaturation	۹۵	۵	۱
Denaturation	۹۴	۱	۳۰
Annealing	۶۳	۱	
Extension	۷۲	۱	
Final Extension	۷۲	۱۰	۱



شکل ۱- تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها به روش انتشار دیسک کربی- بایر

مقاومت چند دارویی در تمامی سویه‌های موردبررسی (٪۱۰۰) مشاهده گردید. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌ها در نمودار ۱ نشان داده‌شده است.

بر اساس سنجش میزان تشکیل بیوفیلم سویه‌ها مطابق فرمول ارائه‌شده، از ۳۷ سویه *سودوموناس آئروژینوزا*، تعداد ۲۹ سویه

www.SID.ir

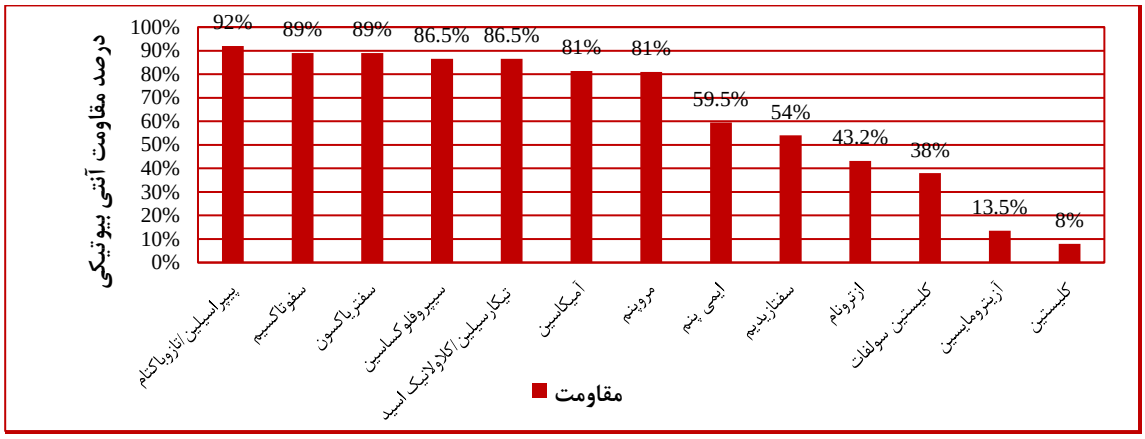
Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 14:16 +0330 on Tuesday January 21st 2020

یعنی ۷۸/۳٪ قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که شامل (۵/۴٪) ۲ تولیدکننده بیوفیلم قوی، (۳۲/۴٪) ۱۲ تولیدکننده بیوفیلم متوسط و (۴۰/۵٪) ۱۵ تولیدکننده بیوفیلم ضعیف بودند. علاوه بر این، ۸ سویه یعنی ۲۱/۷٪ توانایی تشکیل بیوفیلم را نداشتند (شکل ۲). با توجه به اینکه تمام سویه‌ها مقاوم چند دارویی بودند، نمی‌توان نتیجه گرفت که مقاومت آنتی‌بیوتیکی با تشکیل بیوفیلم در ارتباط است.

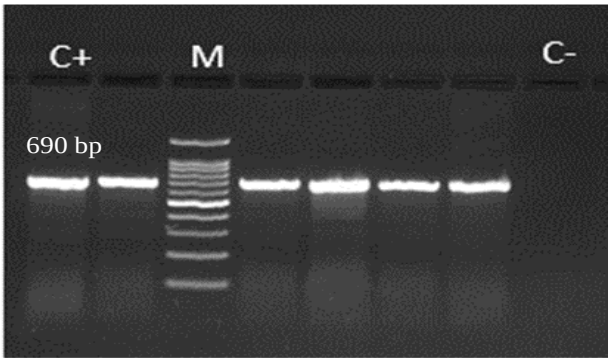
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از واکنش PCR ژن *estA* (شکل ۳)، ۳۶ سویه یعنی ۹۷/۳٪ دارای ژن *estA* بودند و تنها یک‌سویه یعنی ۲/۷٪ فاقد این ژن بود که توانایی تولید بیوفیلم ضعیفی داشت.

نتایج نشان داد که ارتباط معناداری بین حضور ژن استراز و تشکیل بیوفیلم وجود ندارد.



نمودار ۱- میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

شکل ۲- تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌ها به روش میکروتیتر پلیت



شکل ۳- ژل الکتروفورز ژن *estA* حاصل از واکنش PCR.

M: مارکر ۱kb. +C: کنترل مثبت. -C: کنترل منفی. سایر چاهک‌ها محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *estA* سویه‌های بالینی *سودوموناس آئرژینوزا* می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID
ارتباط ژن estA با تشکیل بیوفیلم

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 14:16 +0330 on Tuesday January 21st 2020

بحث

سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک پاتوژن بیمارستانی، عامل عمده عفونت در مراکز سوختگی به‌ویژه در ایران است و با نرخ مرگ‌ومیر بالایی در ارتباط است. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های سوختگی و توسعه مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی، منجر به توسعه سریع مقاومت چندگانه در میان ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* شده است که این مسئله یک نگرانی رو به رشد در بیماران بستری‌شده در مراکز سوختگی است (۱۹). در مطالعه حاضر، مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین/تازوباکتام، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین، تیکارسیلین/کلاولانیک اسید، آمیکاسین و مروپنم در میان سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران سوختگی مشاهده شد. ظرفیت قابل‌توجه این باکتری در مقاومت به بسیاری از داروها، تاکنون توسط محققین زیادی در واحدهای سوختگی گزارش‌شده است.

در مطالعه‌ی رنجبر و همکاران که در سال ۲۰۱۱ در یک مرکز سوختگی در تهران انجام شد، سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران، به ترتیب به آمیکاسین ۹۰٪، سیپروفلوکساسین ۶۵٪، سفتریاکسون ۶۰٪ و سفتازیدیم ۵۷/۵٪ مقاومت نشان دادند که به نتایج حاضر شباهت دارد. میزان مقاومت به ایمی پنم نیز ۹۷/۵٪ گزارش شد که بالاتر از مطالعه حاضر (۵۹٪/۹) بود (۲۰). گودرزی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ در تهران، میزان مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران سوختگی را به آمیکاسین ۹۷/۳٪، سفتازیدیم ۹۸٪/۶، ایمی پنم ۶۴/۴٪ و سیپروفلوکساسین ۱۰۰٪ نشان دادند (۱۹). همچنین، خسروی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در اهواز میزان مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران مبتلابه عفونت‌های زخم و سوختگی را به‌این‌ترتیب گزارش کردند: سیپروفلوکساسین ۷۰/۶۷٪، سفتازیدیم ۶۸٪، آمیکاسین ۵۵/۳۳٪، سفتریاکسون ۷۰٪، سفوتاکسیم ۷۲/۶۷٪ و پیپراسیلین ۴۵/۳۳٪ (۲۱). نتایج حاصل از این پژوهش درصد بالاتری از مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهد که می‌تواند بیانگر افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* باشد. تمامی سویه‌های موردمطالعه دارای مقاومت چند دارویی بودند که با نتایج مطالعه عباس و همکاران در سال ۲۰۱۸ همخوانی دارد (۲۲).

ایجاد عفونت‌های مزمن توسط *سودوموناس آئروژینوزا* عمدتاً به دلیل توانایی باکتری در تشکیل بیوفیلم است (۲۳). تشکیل بیوفیلم به‌عنوان یک مسئله مهم در کنترل عفونت در نظر گرفته‌شده است. تداوم عفونت‌های طولانی‌مدت ناشی از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تشکیل‌دهنده بیوفیلم، مشکلات جدی را در بیمارستان‌های سوختگی ایجاد کرده و درمان عفونت‌های مربوطه، حتی در افراد با پاسخ‌های ایمنی طبیعی، دشوار است. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های بیوفیلم باکتریایی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و اجزای سیستم ایمنی میزبان است. در برخی از مطالعات نشان داده‌شده که سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* که بیوفیلم تولید می‌کنند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و توبرامایسین در غلظتی بیش ازآنچه برای کشتن باکتری‌های پلانکتونی لازم است، مقاومت نشان می‌دهند. این مقاومت احتمالاً به دلیل جمعیت باکتریایی است که توسط ساختار بیوفیلم از درمان محافظت‌شده‌اند (۲۴-۲۶). جبل عاملی و همکاران در سال ۲۰۱۲ و همچنین قنبرزاده کره تاش و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تهران نشان دادند که بیش از ۹۲٪ از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران سوختگی قادر به تولید بیوفیلم هستند که این میزان بالاتر از نتایج به‌دست‌آمده (۷۸٪/۳) از مطالعه حاضر است (۲۶، ۲۷). مشابه نتایج این مطالعه، در مطالعه امامی و همکاران که در سال ۲۰۱۵ در گیلان بر روی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به‌دست‌آمده از فاضلاب یک مرکز سوختگی انجام شد، ۷۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل دادند و همچنین نشان دادند که سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم نسبت به آن‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری داشتند (۲۶). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر، ازآنجایی‌که همه‌سویه‌ها مقاومت چند دارویی داشتند اما همه آن‌ها قادر به تولید بیوفیلم نبودند، ارتباط معناداری میان تولید بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده نشد. در مطالعه‌ای دیگر، حیدری و افتخار در سال ۲۰۱۵ در بیمارستان شهید مطهری تهران نشان دادند که سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران سوختگی در این بیمارستان ۴۳/۵٪ بیوفیلم تشکیل دادند (۲۵)، که این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در منطقه جغرافیایی موردمطالعه و درنتیجه تنوع و تفاوت در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 14:16 +0330 on Tuesday January 21st 2020

سویه‌های ایجادکننده عفونت باشد. ویلهلم[1] و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که فعالیت آنزیم استراز *estA* بر تشکیل و ساختار بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* تأثیرگذار است (۲۹). در سال ۲۰۱۰ نیز تیلن[2] و همکاران تأثیر *estA* را بر بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* SG81 بررسی کردند و فعالیت‌های افزایش‌یافته برای این آنزیم در بیوفیلم های تولیدشده توسط این باکتری را گزارش کردند. همچنین مشاهده کردند که سویه‌هایی که بیان *estA* و *lasB* را از دست دادند، به‌طور کامل توانایی تولید ساختار سه‌بعدی بیوفیلم را نیز از دست دادند (۱۱). در مطالعه حاضر نیز، با استفاده از تکنیک PCR حضور ژن *estA* بررسی گردید که مشخص شد از مجموع ۳۷ نمونه تنها یک نمونه فاقد این ژن بود که توانایی تشکیل بیوفیلم ضعیفی داشت.

نتیجه‌گیری

این نتایج نشان می‌دهند که حضور ژن *estA* با توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در ارتباط نیست. احتمالاً ژن‌ها یا فاکتورهای دیگری نیز وجود دارند که در تشکیل بیوفیلم مؤثر هستند؛ بنابراین، برای دستیابی به نتایج بهتر باید عوامل دیگر نیز در نظر گرفته شوند. این نتایج به همراه نتایج حاصل از تمامی پژوهش‌های پیشین بیانگر این موضوع هستند که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی میان گونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* رو به افزایش است. این افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در خصوص باکتری‌های بیماری‌زای شایعی همچون *سودوموناس آئروژینوزا* بسیار قابل‌توجه و نگران‌کننده است زیرا روند درمان را با مشکل مواجه می‌سازد و مشکلات جدی را برای بیماران به وجود می‌آورد؛ بنابراین توصیه می‌شود قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک، تولید بیوفیلم توسط سویه‌ها نیز موردبررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کارکنان محترم بیمارستان سوانح و سوختگی طالقانی شهرستان اهواز، مسئولان پژوهشی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز و همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند. شماره مصوب پایان‌نامه در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد ۱۳۳۳۰۵۰۷۹۴۲۰۲۹ است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Japoni A, Farshad S, Alborzi A. *Pseudomonas aeruginosa*: burn infection, treatmentand antibacterial resistance. Iran Red Crescent Med J. 2009; 11(3): 244-253.
2. Sivaraj S, Murugesan P, Muthuvelu S, Purusothaman S, Silambarasan A. Comparative study of *Pseudomonas aeruginosa* isolate recovered from clinical and environmental samples against antibiotics. Int J Pharm Pharm Sci. 2012; 4(3): 103-107.
3.Mardaneh J, Ahmadi KH, Jahan Sepas A. Determination antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Taleghani Hospital (Ahvaz, Iran) from 2011-2012. JFUMS. 2013; 3(3): 188-193. [In Persian]
4. Pires D, Sillankorva S, Faustino A, Azeredo J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. Res Microbiol. 2011; 162(8): 798-806.
5. Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Narimani T, Arabestani MR, Ghoddousi AR. *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. J Res Med Sci. 2012; 17(4): 332-337.
6. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013; 67(3): 159-173.
7. Kozirog A, Otlewska A, Brycki B. Viability, enzymatic and protein profiles of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells after monomeric/gemini surfactant

[1] Wilhelm
[2] Tielen

www.SID.ir

Archive of SID
ارتباط ژن estA با تشکیل بیوفیلم

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 14:16 +0330 on Tuesday January 21st 2020

treatment. Molecules. 2018; 23: 1-13.

8. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microbiol. 2009; 11(7): 1034-1043.
9. Lieleg O, Caldara M, Baumgartel R, Ribbeck K. Mechanical robustness of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Soft Matter. 2011; 7(7): 3307-3314.
10. Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. Crit Care Med. 2009; 37(5): 1777-1786.
11. Tielen P, Rosenau F, Wilhelm S, Jaeger K, Flemming H, Wingender J. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. 2010; 156: 2239-2252.
12. 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. Iran J Microbiol. 2013; 5(1): 36-41.
13. Fatima A, Naqvi SB, Khaliq SA, Perveen S, Jabeen S. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infections. Springer Plus. 2012; 1(1): 70.
14. Ghane M, Azimi Z. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of Pseudomonas spp. Isolated from hospital environment in Tonekabon, north of Iran. J Appl Environ Microbiol. 2014; 2(4): 97-101.
15. Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. Iran Red Crescent Med J. 2014; 16(1): e15722.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100–S25 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 22nd informational supplement. Wayne (PA); CLSI. 2015.
17. Abidi SH, Sherwani SK, Siddiqui TR, Bashir A, Kazmi SU. Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. BMC Ophthalmol. 2013; 13(57): 1-6.
18. Nyenje ME, Gree E, Ndip RN. Biofilm formation and adherence characteristics of *Listeria ivanovii* strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. The Scientific World Journal. 2012; 2012:873909. doi:10.1100/2012/873909.
19. Goudarzi M, Azad M, Seyedjavadi SS, Goudarzi Gh, Rashidian M. Study of flagellin profiling in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA) isolated from burn wound infections, Tehran, Iran. J Paramed Sci. 2014; 5(3): 40-45.
20. Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in major burn center in Tehran, Iran. Acta Med Iran. 2011; 49(10): 675-679.
21. Khosravi AD, Hoveizavi H, Mohammadian A, Farahani A, Jenabi A. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. Acta Cir Bras. 2016; 31(3): 206-211.
22. Abbas HA, El-Ganiny AM, Kamel HA. Phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from urinary tract infections. Afri Health Sci. 2018;18(1): 11-21.
23. Roshani-Asl P, Rashidi N, Shokoohizadeh L, Zarei J. Relationship among antibiotic resistance, biofilm formation and *lasB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Clin Lab. 2018; 64: 1477-1484.
24. Chen H, Wubbolts RW, Haagsman HP, Veldhuizen EJA. Inhibition and eradication of Pseudomonas aeruginosa biofilms by host defence peptides. Sci Rep. 2018; 8(1): 10446.
25. Heydari S, Eftekhar F. Biofilm formation and β-Lactamase production in burn isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(3): e15514.
26. Emami S, Nikokar I, Ghasemi Y, Ebrahimpour M, Ebrahimi-Saraie HS, Araghian A, et al. Antibiotic resistance pattern and distribution of *pslA* gene among biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from waste water of a burn center. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(11): e23669.
27. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz S, Asadollahi P, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Burns. 2012; 38(8): 1192-1197.
27. Ghanbarzadeh Corehtash Z, Khorshidi A, Firoozeh F, Akbari H, Mahmoudi Aznaveh A. Biofilm fo8rmation and virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(10): e 22345.
29. Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. J Bacteriol. 2007; 189(18): 6695–6703.

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 14:16 +0330 on Tuesday January 21st 2020

Original Article

Survey of Antibiotic Resistance and Relationship Between Eesterase *(estA)* Gene with Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Isolated from Burn Patients

Roshani Asl P[1], Rashidi N[2]*, Shokoohizadeh L[3], Tajbakhsh E[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Department of Medical Laboratory Sciences, School of Para Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 24 Nov 2018 Accepted: 01 Jul 2019

Abstract

Background & Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is known as a major cause of hospital-acquired infections due to its high antibiotic resistance. Biofilm formation is an important virulence factor in *P. aeruginosa* infections. This pathogen produces extracellular hydrolases such as esterase estA during biofilm formation which can influence the formation and construction of biofilm. The purpose of this study was to detect the antibiotic resistance and distribution of *estA* gene among biofilm-producing *P. aeruginosa* strains isolated from burn patients.

Materials & Methods: A total of 37 strains of *P. aeruginosa* were isolated from burn patients in Taleghani hospital in Ahvaz and identified using standard bacteriological procedures. Antibiotic susceptibility test was performed by disk diffusion method according to the CLSI 2015. Biofilm formation was measured by micro titer plate. Existence of *estA* gene was detected by PCR.

Results: The *estA* gene existed in 97.3% of isolates and 78.3% of *P. aeruginosa* isolates produced biofilm. Based on the results of the antibiogram test, the highest rate of resistance was observed to piperacillin/ tazobactam (92%) and least resistance was to colistin (8%).

Conclusion: According to the results, there were no significant correlations between presence of *estA* gene and biofilm formation. High level of resistance to antibiotics in *P. aeruginosa* is considerable.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa, estA*, Biofilm, Antibiotic Resistance

***Corresponding Author: Rashidi Niloufar,** Department of Medical Laboratory Sciences, School of Para Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: ni.rashidi@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-6439-7498