Archive of SID

Original Article

Determination of Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis (CF) Referred to Gholhak Pathobiology Laboratory in Tehran City During 2016-2018

***Fahime Baghbani-Arani*[1], *Mahsa Sharifan*[2], *Elahe Mahmoodi-Khaledi*[3*]**

[1]*Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Sciences, Varamin - Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.*

[2]*Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Varamin - Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.*

[3]*Department of Cell and Molecular Biology, School of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
ElaheMahmoodi-Khaledi;
Department of Cell and Molecular Biology, School of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran.

Email:
e.mahmoodi_kh@kashanu.ac.ir,
e.mahmoodi_kh@yahoo.com

Received: 29 Nov, 2019
Accepted: 24 Feb, 2020

Abstract

Background and Objectives: *Pseudomonas aeruginosa*strains isolated from lungs of cystic fibrosis (CF) patients are often heterogeneous and antibiotic resistant strains. In this regard, in the current study, the antibiotic resistance properties and genetic diversity of these bacteria, were investigated using repetitive-element-based molecular assay in the samples isolated from patients in Iran.

Methods: This study was performed as a descriptive cross-sectional study on 100 strains of *P. aeruginosa* isolated from CF patients. The isolates were diagnosed using standard biochemical tests and then their antibiotic resistance pattern was determined. Molecular diversity of the strains was determined by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - *Polymerase Chain Reaction* (ERIC - PCR) and BOX A1R-PCR methods.The correlation between molecular types and antibiotic resistance pattern, was determined by chisquare test.

Results: The findings indicated that the prevalence of multiple drug resistant isolates was 35%, while, only two strains hadhypermutator phenotypes (HP). Most of the isolates (96%), were resistant to rifampin and the highest susceptibility,was to streptomycin, imipenem, and meropenem (96%, 93%, and 94%, respectively). Molecular analysis revealed that BOXA1R-PCR fingerprinting produced 24 patterns in 8 clusters, while, ERIC-PCR resulted in 26 patterns in 9 clusters in the total population.

Conclusion: The high prevalence of diversity and multiple antibiotic resistance in *P. aeruginosa* strains isolated fromCF patientsthreatens the public health in Iran. Therefore, the findings of the present studycould lead to understanding of the evolution of this bacterium in CF patients and help to find newer drug targets for the control of chronic CF infection.

Keywords: Cystic fibrosis; *Pseudomonas aeruginosa*; Antibiotics resistance; Molecular; Pathobiology; Genetic Variation.

DOI: 10.29252/qums.13.12.55

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره سیزدهم، شماره دوازدهم، اسفند ۹۸
صفحه ۵۵ الی ٦٤
Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تعیین ویژگی‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مولکولی *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از مبتلایان به سیستیک فیبروزیس (CF) مراجعه‌کننده به آزمایشگاه پاتوبیولوژی قلهک در شهر تهران طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵

فهیمه باغبانی آرانی[۱]، مهسا شریفان[۲]، الهه محمودی خالدی[۳]*

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از ریه بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس (CF: Cystic Fibrosis) اغلب سویه‌هایی هتروژن و مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند. در این ارتباط، در مطالعه حاضر به بررسی ویژگی‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین تنوع ژنتیکی این باکتری با استفاده از یک روش مولکولی مبتنی بر توالی‌های تکراری در نمونه‌های جداشده از بیماران ایرانی پرداخته شد.

روش بررسی: این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی در ارتباط با ۱۰۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* که از مبتلایان به CF جداسازی شده بودند، انجام شد. جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی و سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها تعیین شدند. تنوع سویه‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction) و BOX A1R-PCR (BOX A1R-Based Repetitive Extragenic Palindromic-PCR) تعیین گردید. ارتباط بین انواع مولکولی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز با استفاده از آزمون آماری مربع کای مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاکی از آن بودند که ۳۵ درصد از سویه‌ها مقاومت چند دارویی داشته‌اند؛ در حالی که تنها دو سویه فنوتیپ جهش‌یافته قوی (HP: Hypermutator) را از نشان دادند. اکثر سویه‌ها (۹۶ درصد) به ریفامپین مقاوم بودند و بیشترین میزان حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۹۶ درصد)، ایمی‌پنم و مروپنم (به ترتیب با ۹۳ و ۹۴ درصد) بود. در بررسی مولکولی، BOX A1R-PCR توانست ۲۴ الگو را در هشت خوشه و ERIC-PCR ۲۶ الگو را در نه خوشه در کل جمعیت ایجاد کند.

نتیجه‌گیری: فراوانی بالای تنوع و مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران CF در ایران، تهدیدکننده سلامت جامعه می‌باشد؛ بنابراین یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند به درک تکامل این باکتری در بیماران CF و کمک به یافتن اهداف دارویی جدیدتر برای کنترل عفونت مزمن CF منجر شود.

کلیدواژه‌ها: سیستیک فیبروزیس؛ *سودوموناس آئروژینوزا*؛ مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی؛ مولکولی، پاتوبیولوژی؛ تنوع ژنتیکی.

[۱]گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

[۲]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

[۳]گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
الهه محمودی خالدی؛ گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
e.mahmoodi_kh@kashanu.ac.ir
e.mahmoodi_kh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۵

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Baghbani-Arani F, Sharifan M, Mahmoodi-Khaledi E. Determination of Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis (CF) Referred to Gholhak Pathobiology Laboratory in Tehran City During 2016-2018. Qom Univ Med Sci J 2020;13(12):55-64. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

مقدمه

سیستیک فیبروزیس (CF) یک اختلال ژنتیکی اتوزومال مغلوب است که موجب تولید مخاط غیر طبیعی در اندام‌های تنفسی، گوارشی و تناسلی می‌شود. اتصال و کلونیزه شدن برخی از باکتری‌ها روی این مخاط غلیظ و چسبنده به ویژه در راه‌های تنفسی با ایجاد عفونت‌های مزمن، بیماری‌های پیشرونده و حتی انسداد مجاری تنفسی و اغلب مرگ و میر بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس همراه است (۲،۱). یکی از باکتری‌های مطرح در این عفونت‌ها، *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد که با کلونیزه شدن این باکتری در راه‌های هوایی، ریشه‌کن کردن عفونت بسیار دشوار و گاهی غیر ممکن است (۳). طی دوره عفونت، جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تحت تأثیر برخی تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی عمیق قرار می‌گیرند تا از این طریق با محیط ریه CF سازگار شوند و بقای آن‌ها با به حداکثر رسیدن تنوع در جمعیت سلولی ارتقا یابد (۲).

در واقع طی عفونت مزمن، عوامل استرسی شامل: سیستم ایمنی ذاتی میزبان، آنتی‌بیوتیک‌ها و رشد در یک محیط میکروآئروفیل/بی‌هوازی به انتخاب چندین فنوتیپ *سودوموناس آئروژینوزا* با تنوع ژنتیکی کمک می‌کند (۴). قابل توجه است که غالباً فراوانی جهش‌ها و متعاقباً انتخاب تعدادی از جهش‌های سازگار در جمعیت‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* که با عنوان فنوتیپ‌های جهش‌یافته قوی (HPM: Hypermutators) شناخته می‌شوند، به دلیل سیستم ترمیم ناکارآمد DNA آن‌ها به سرعت در حال افزایش است (۶،۵). فنوتیپ‌های HPM بارها و بارها با یک نسبت بالا در مقایسه با آنچه که در عفونت‌های حاد وجود دارد، از جدایه‌های بیماران مبتلا به CF مشاهده شده و پیشنهاد می‌کند که این مکانیسم ممکن است نقش مهمی را در پاتوژنز عفونت مزمن ریه ایفا کند (۴). ثابت شده است که وجود سویه‌های جهش‌یافته با نرخ بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران دارای عفونت مزمن تنفسی در ارتباط است (۷،۶).

تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی جزء مهمی از بررسی‌های اپیدمیولوژیک بیماری‌های عفونی می‌باشد. به طور کلی، روش‌های تیپ‌بندی به دو گروه عمده روش‌های فنوتیپی (که محصولات بیان یک ژن یا ژن‌های خاصی را جهت اهداف اپیدمیولوژیک دنبال می‌کنند و تغییرپذیری بالایی دارند) و ژنوتیپی (که مبتنی بر بررسی ساختار ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند) تقسیم می‌گردند. از مزایای تیپ‌بندی ژنوتیپی می‌توان به قدرت افتراق‌دهی بالاتر، کاربرد گسترده‌تر برای انواع مختلف گونه‌های میکروبی و سرعت بالا اشاره نمود (۹،۸).

سودوموناس آئروژینوزا از تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی بالایی برخوردار می‌باشد. روش‌های تیپ‌بندی ژنتیکی براساس PCR که در آن‌ها سکانس‌های حفظ شده و توالی‌های تکراری در ژنوم باکتری‌ها مورد تکثیر قرار می‌گیرند (مانند rep-PCR (ERIC-PCR یا Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus و BOX A1R-PCR یا BOX A1R-Based Repetitive Extragenic Palindromic) از رایج‌ترین این روش‌ها محسوب می‌شوند. در این روش‌ها تیپ‌بندی براساس توزیع تصادفی قطعات تکرارشونده داخل ژنوم صورت گرفته و براساس آن‌ها می‌توان ارگانیسم‌ها را از یکدیگر متمایز کرد (۱۰). با توجه به مطالب بیان شده، مطالعه حاضر با هدف بررسی وجود سویه‌های HPM از *سودوموناس آئروژینوزا* در عفونت مزمن سیستیک فیبروزیس و مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و الگوی ژنتیکی این سویه‌ها با سویه‌های معمولی به روش rep-PCR انجام شد.

روش بررسی

جمع‌آوری و شناسایی سویه‌های میکروبی

این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی در ارتباط با ۱۰۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از مبتلایان به CF که طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵ به آزمایشگاه پاتوبیولوژی قلهک مراجعه کرده بودند، انجام شد. به منظور شناسایی سویه‌های مورد آزمون در کنار رنگ‌آمیزی گرم و بررسی ظاهر کلنی از نظر موکوئیدی یا صاف بودن، آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شامل: کشت روی محیط‌های افتراقی EMB (Eosin Methylene Blue)، SIM (Sulfide Indole Motility)، TSI (Triple Sugar Iron) و سیمون سیترات آگار و

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

آزمون‌های اکسیداز و کاتالاز به کار گرفته شد. کلیه محیط‌های کشت و مواد مصرفی در این مطالعه از شرکت Merck (کشور آلمان) خریداری شده بودند. نمونه‌ها در محیط TSB (Tryptic Soy Broth) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شایان ذکر است که پژوهش حاضر مطابق با پروتکل کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه ورامین با کد اخلاق IR.IAU.VARAMIN.REC.1397.027 انجام شده است.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

حساسیت سویه‌های میکروبی مورد بررسی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش Kirby-Bauer مطابق با استانداردهای CLSI ارزیابی شد (۱۱). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده از شرکت Himedia (کشور هند) خریداری شده و حاوی سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۵۰۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، پیپراسیلین (۱۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم) بودند.

غربالگری جهش‌یافته‌ها

برای بررسی میزان جهش‌پذیری سویه‌ها از ۱۵ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، استفاده گردید. به طور خلاصه، کشت تازه‌ای از سویه‌ها تهیه شد و از هریک سه کلنی برای تلقیح ۴ میلی‌لیتر از محیط مولر هینتون براث به کار گرفته شد. پس از رشد ۲۴ ساعته سویه‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-6}، 10^{-7} و 10^{-8} در محیط مولر هینتون آگار و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{0}، 10^{-1} و 10^{-2} در محیط مولر هینتون آگار حاوی ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپین (MH-Rif) با سه تکرار از هریک تلقیح شدند و در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت گرماگذاری گردیدند. نرخ جهش از طریق محاسبه تقسیم تعداد کل جهش‌یافته‌های مقاوم به ریفامپین که از تعداد کلنی‌های ظاهر شده روی محیط MH-Rif به دست آمده بودند، بر تعداد کل کلنی‌های ظاهر شده روی محیط غیر انتخابی به دست آمد. چنانچه پاسخ این تقسیم برای سویه‌ای معادل $\geq 2\times10^{-7}$ محاسبه می‌شد، آن سویه جهش‌یافته قوی یا HPM، بین $2\times10^{-7} >$ و $\geq 2\times10^{-8}$ جهش‌یافته ضعیف و $2\times10^{-8} >$ غیر جهش‌یافته به شمار می رفت (۱۲،۸).

استخراج DNA

جهت استخراج DNA ژنومی از کیت Bioneer (کشور کره) استفاده شد. برای بررسی کمی DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و برای بررسی کیفی آن از الکتروفورز روی ژل ۰/۸ درصد آگارز استفاده گردید.

Rep-PCR (BOX A1R و ERIC)

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مورد مطالعه از دو روش PCR (BOX A1R و ERIC) استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ قید شده است. صحت این پرایمرها پیش از PCR با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Runner 6.5.50 و ابزار BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) مورد تأیید قرار گرفته است (۱۳).

برای انجام هریک از فرایندهای PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در هر محلول واکنش، ۱۵ میکرولیتر از مخلوط آماده (Master mix)، ۱ میکرولیتر از محلول پرایمر با غلظت ۵ پیکومول بر میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از محلول DNA ژنومی با تراکم ۴۰ نانوگرم بر میکرولیتر و ۳ میکرولیتر آب دیونیزه به کار رفت. در این پژوهش برنامه زمانی دمایی دستگاه به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در ۳۵ سیکل صورت گرفت. پس از انجام PCR، محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید از باندهای به دست آمده عکس‌برداری گردید.

آنالیز نتایج

در این مرحله باندهای مربوط به هر سویه با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.0 (شرکت omicX، کشور فرانسه) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت دندروگرام مربوطه با استفاده از روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) و ضریب تشابه جاکارد رسم شد.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

به منظور آنالیز آماری نتایج از نرم‌افزار IBM SPSS 23 (محصول شرکت IBM، ایالات متحده آمریکا) استفاده گردید و سطح معناداری در کلیه آزمون‌ها (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر ۱۰۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* از خلط بیماران CF مراجعه‌کننده به آزمایشگاه قلهک جداسازی شد. از ۱۰۰ سویه تحت بررسی، ۵۵ سویه از جنس مذکر و ۴۵ سویه از جنس مؤنث جداسازی شدند. بازه سنی بیماران ۱ تا ۳۶ سال بود. این افراد به گروه‌های سنی مختلف تقسیم شدند و در ادامه، فراوانی سویه‌های جدا شده از هر گروه تعیین گردید (شکل ۱). همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، فراوانی سویه‌های جدا شده با افزایش سن در بیماران کاهش می‌یابد. بیشترین سویه‌ها از گروه سنی ۱۲-۹ سال جداسازی شدند و متوسط سن بیماران ۱۱/۲ سال بود.

در این مطالعه حساسیت تمامی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. نتایج نشان دادند که اغلب سویه‌ها با فراوانی ۹۶ درصد به آنتی‌بیوتیک ریفامپین مقاوم هستند و بیشترین میزان حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (با فراوانی ۹۶ درصد) و ایمی‌پنم و مروپنم (به ترتیب با ۹۳ و ۹۴ درصد) می‌باشد. میزان مقاومت به نورفلوکساسین (NX: Norfloxacin) ۳۳ درصد، پیپراسیلین (PIP: Piperacillin) ۳۱ درصد، سیپروفلوکساسین (CIP: Ciprofloxacin) ۲۴ درصد، جنتامایسین (GEN: Gentamicin) ۲۱ درصد، توبرامایسین (TOB: Tobramycin) ۱۴ درصد و آمیکاسین (AK: Amikacin) ۱۰ درصد بود. هیچ‌یک از سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نیمه‌حساس نبودند. در این مطالعه سویه‌های موکوئیدی و صاف در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با یکدیگر تفاوت معناداری نداشتند (برای کلیه آنتی‌بیوتیک‌ها مقدار P<۰/۰۵ بود).

غربالگری سویه‌های جهش‌یافته از میان ۱۵ سویه مقاوم به آنتی‌بیوتیک که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، نشان داد که دو سویه جهش‌یافته قوی یا HPM بودند.

این دو سویه که به هفت آنتی‌بیوتیک مورد استفاده مقاوم بودند، ظاهر کلنی آن‌ها صاف بود. ۱۳ سویه باقیمانده همگی از نرخ جهش ضعیف برخوردار بودند و فقط یکی از آن‌ها کلنی موکوئیدی داشت. در این مطالعه میان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جهش‌یافته ضعیف و قوی تفاوت معناداری وجود نداشت (برای تمام آنتی‌بیوتیک‌ها (P<۰/۰۵).

در این مطالعه جهت بررسی تنوع سویه‌ها از دو روش تیپ‌بندی ژنتیکی براساس PCR استفاده شد. در روش ERIC-PCR در مجموع ۲۶ باند مجزا در محدوده bp ۲۰۰-۱۲۵۰ ایجاد شد که از میان آن‌ها یک باند در تمام سویه‌ها مشترک و ۲۵ باند متنوع بودند (شکل ۲-الف). در روش BOX A1R-PCR نیز در مجموع ۲۴ باند مجزا در محدوده bp ۲۰۰-۱۲۰۰ ایجاد شد (شکل ۲-ب).

جهت آنالیز نتایج فوق، باندهایی که دارای تکرارپذیری بالایی بودند انتخاب شده و محاسبه گردیدند. بررسی شکل‌ها و دندروگرام حاصل از ERIC-PCR نشان دادند که تمامی نمونه‌ها در نه خوشه مجزا قرار گرفتند و در این روش برای تکنیک ERIC-PCR، ۴۹ الگو به دست آمد (شکل ۳-الف). آنالیز شکل‌ها و دندروگرام حاصل از BOX A1R–PCR نیز نشان داد که تمامی نمونه‌ها در هشت خوشه مجزا قرار می‌گیرند. در این مرحله ۸۳ الگو به دست آمد (شکل ۳-ب). در هر دو دندروگرام، خوشه III بیشترین فراوانی سویه‌ها را در بین خوشه‌ها به خود اختصاص داد (جدول ۲). در این مطالعه ارتباط معناداری میان مورفولوژی سویه‌ها با تیپ‌بندی ژنتیکی آن‌ها به روش‌های BOX A1R-PCR و ERIC-PCR مشاهده نشد (به ترتیب P=۰/۶۱۶ و P=۰/۸۷۵).

در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی خوشه‌های مختلف مشاهده گردید که در هر دو روش BOX A1R-PCR و ERIC-PCR به استثنای خوشه III (در هر دو روش)، VI (در روش ERIC) و VII (در روش BOX A1R)، سایر خوشه‌ها به آنتی‌بیوتیک ریفامپین مقاوم بودند. خوشه II حاصل از BOX A1R-PCR به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین مقاوم بود. در خوشه‌های حاصل از ERIC-PCR، خوشه IV به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و نورفلوکساسین، خوشه V به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و پیپراسیلین، خوشه VIII به

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

نورفلوکساسین و خوشه IX به جنتامایسین مقاوم بودند. در مجموع، خوشه V در هر دو روش از بالاترین درصد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (با میانگین ۴۵ درصد) برخوردار بود (جدول ۳).

در مطالعه حاضر میان خوشه‌های حاصل از BOX A1R-PCR در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، ایمی‌پنم و مروپنم تفاوت معناداری وجود داشت (به ترتیب P=۰/۰۰۴، P=۰/۰۴۴ و P=۰/۰۱۲). میان خوشه‌های حاصل از ERIC-PCR در مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین تفاوت معناداری وجود داشت (P=۰/۰۰۹).

بر مبنای نتایج، ۳۵ سویه (۳۵ درصد از سویه‌ها) مقاومت چند دارویی (مقاومت به بیش از دو آنتی‌بیوتیک) داشتند؛ به نحوی که ۱۴ سویه به سه آنتی‌بیوتیک، نه سویه به چهار آنتی‌بیوتیک، چهار سویه به پنج آنتی‌بیوتیک، چهار سویه به شش آنتی‌بیوتیک و دو سویه به هفت آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مقاوم بودند. تنها دو سویه به تمامی ۱۰ آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش مقاومت داشتند که یکی از این سویه‌ها در خوشه III هر دو روش تایپینگ و دیگری در خوشه I روش BOX A1R-PCR و خوشه III روش ERIC-PCR قرار داشت.

بحث

عفونت مزمن تنفسی یا CRI (Chronic Respiratory Infection) با *سودوموناس آئروژینوزا* عامل اصلی مرگ و میر در بیماران سیستیک فیبروزیس (CF) است. استقرار *سودوموناس آئروژینوزا* در CRI به واسطه یک فرایند سازگاری پیچیده است که شامل تغییرات فیزیولوژیکی ایجاد شده توسط فعال شدن مسیرهای تنظیمی خاص از جمله القای حالت بیوفیلم رشد یا بیان افتراقی ژن‌های بیماری‌زا و نیز تغییرات ژنتیکی می‌باشد که منجر به انتخاب تعداد مهمی از جهش‌های سازگار مورد نیاز برای ماندگاری طولانی مدت مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۶). با وجود پیشرفت‌های به دست آمده در زمینه تهیه آنتی‌بیوتیک‌های ضد سودوموناسی، هنوز دوز لازم برای از بین بردن این باکتری در عفونت‌های مزمن ناشی از سودوموناس بسیار بیشتر از میزان معمول آن می‌باشد (۱۴).

شایان ذکر است که مقاومت‌های چند دارویی این باکتری، درمان آنتی‌بیوتیکی را با شکست مواجه می‌کند (۱۵).

نسبت بالای جهش در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران سیستیک فیبروزیس با عفونت مزمن در مقابل آنچه که در عفونت حاد مشاهده می‌شود، نشان می‌دهد که افزایش نرخ جهش و انتخاب مؤثر سویه‌های جهش‌یافته ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز عفونت مزمن ریه داشته باشد؛ همچنین انتظار می‌رود سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با تنوع ژنتیکی بیشتر نسبت به سویه‌های عفونت حاد ایجاد کند (۴).

در این مطالعه شیوع عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* در ۱۰۰ سویه که طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵ از مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه قلهک جداسازی شده بودند، بررسی گردید. بر مبنای نتایج، شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* در مردان (۵۵ درصد) بالاتر از زنان (۴۵ درصد) بود. در این ارتباط، نتایج مشابهی در دیگر مطالعات نیز گزارش شده است (۱۷،۱۶). در پژوهش حاضر بیشترین سویه‌ها از گروه سنی ۱۲-۹ سال جداسازی شدند. متوسط سن بیماران ۱۱/۲ سال بود. نکته مهم آن بود که با افزایش سن، شیوع عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* به طور معناداری در هر دو جنس کاهش می‌یافت (P=۰/۰۰۳) که این یافته با نتایج پژوهش Pittman و همکاران مطابقت داشت (۱۸).

در مطالعه حاضر آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (با فراوانی ۹۶ درصد) و ایمی‌پنم و مروپنم (به ترتیب با ۹۳ و ۹۴ درصد) بیشترین اثرات ضد میکروبی را داشتند. آمیکاسین (با فراوانی ۹۰ درصد) و توبرامایسین (با فراوانی ۸۶ درصد) نیز در رتبه چهارم و پنجم فعالیت ضد میکروبی قرار داشتند. مشابه با این یافته‌ها، حساسیت *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم، آمیکاسین و توبرامایسین در بسیاری از گزارشات داخلی و خارجی دیگر قابل مشاهده است (۱۶،۲۰-۱۹). نکته قابل توجه، حساسیت بالای سویه‌های مورد مطالعه به استرپتومایسین بود که تقریباً هیچ‌گاه به عنوان داروی مؤثر در درمان عفونت‌های سودوموناسی مطرح نمی‌باشد؛ زیرا این آنتی‌بیوتیک از گروه آمینوگلیکوزیدها است.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

سودوموناس آئروژینوزا قادر است با تولید آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AME: Aminoglycosides Modifying Enzyme) و با اضافه کردن گروه‌های استیل، فسفات یا آدنیل به ساختار این آنتی‌بیوتیک‌ها، ساختمان و در نتیجه عملکرد آن‌ها را دستخوش تغییر قرار دهد. در مقایسه با سایر آمینوگلیکوزیدها، آمیکاسین و توبرامایسین معمولاً سوبستراهای ضعیفی برای این آنزیم‌ها هستند؛ از این رو فعالیت آنتی‌بیوتیکی بهتری را در مقابل *سودوموناس آئروژینوزا* ارائه می‌دهند. از سوی دیگر، تغییر در ساختار ریبوزوم که مکان هدف این آنتی‌بیوتیک‌ها است و نیز کاهش نفوذپذیری باکتری به این عوامل ضد میکروبی از دیگر عوامل مقاومت در *سودوموناس آئروژینوزا* به شمار می‌روند. بر این اساس و نیز به دلیل نفوذ کم آمینوگلیکوزیدها به بافت ریه، ترکیب آن‌ها با یکی از β-لاکتام‌های مهارکننده *سودوموناس آئروژینوزا* نظیر پیپراسیلین/تازوباکتام و یا یک کارباپنم توصیه می‌شود (۲۲،۲۱).

در این راستا در مطالعه‌ای که توسط طباطبایی و همکاران انجام شد، اثر ضد میکروبی جنتامایسین علیه *سودوموناس آئروژینوزا* پس از آمینوگلیکوزیدهای توبرامایسین و آمیکاسین قرار داشت که با نتایج مطالعه حاضر همراستا بود (۱۷). نرخ حساسیت *سودوموناس آئروژینوزا* به سیپروفلوکساسین در بیشتر مراکز درمانی دنیا بین ۵۷ تا ۸۰ درصد گزارش شده است که با یافته‌های مطالعه حاضر (با فراوانی ۷۶ درصد) همخوانی دارد (۱۷).

در این پژوهش بالاترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به ریفامپین با ۹۶ درصد مقاومت بود. همسو با این یافته، گزارشات دیگر نیز به مقاومت بالا و حتی ۱۰۰ صد *سودوموناس آئروژینوزا* به این آنتی‌بیوتیک اشاره کرده‌اند که تنها کاربرد آن در کنار آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر کارباپنم یا کلیستین موجب بهبود عملکرد این آنتی‌بیوتیک‌ها در مهار سویه‌های مقاوم چند دارویی (MDR: Multiple Drug Resistance) می‌گردد (۲۳). درصد مقاومت چند دارویی در مطالعه حاضر ۳۵ درصد بود که حدود دو برابر میزان گزارش شده در مطالعات مشابه است (۲۴،۱۷)؛ اما در اروپا، گزارش اخیر European Centre for Disease Prevention and Control) ECDC) (مرکز کنترل بیماری‌های اروپا) که در سال ۲۰۱۶ منتشر شد نشان داد که ۳۳/۹ درصد از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* حداقل به یکی از گروه‌های ضد میکروبی تحت کاربرد (پیپراسیلین±تازوباکتام، فلوروکینولون، سفتازیدیم، آمینوگلیکوزیدها و کاربا‌پنم‌ها) مقاوم هستند (۲۱).

در مطالعه حاضر نرخ جهش‌پذیری سویه‌ها در ۱۵ سویه که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که دو سویه که نسبت به هفت آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مقاومت داشتند، جهش‌یافته قوی (HPM) و ۱۳ سویه دیگر جهش‌یافته ضعیف می‌باشند. همان طور که انتظار می‌رفت، این دو سویه HPM از نرخ بالای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها برخوردار بودند. مشابه با پژوهش حاضر، Luts و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی سویه‌های HPM از *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران CF و ارتباط آن با مقاومت ضد میکروبی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که HPM بودن گونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* می‌تواند مقاومت دارویی را تشدید نموده و درمان را با مشکل مواجه کند (۲). به طور مشابه، Montanari و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی اثرات بیولوژیکی هایپرموتاسیون در *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران دارای CF پرداختند و به این نتیجه رسیدند که این مکانیسم ممکن است نقش مهمی در عفونت مزمن ریوی داشته باشد؛ زیرا هایپرموتاسیون ممکن است باعث افزایش احتمال تولید انواع سویه‌های سازگار شود و یک مزیت انتخابی برای باکتری در شرایط استرس‌زا مانند حضور آنتی‌بیوتیک‌ها و یا نوسانات محیطی باشد (۴). در پژوهش Mandsberg و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ گزارش گردید که نرخ بالای جهش در برخی از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با افزایش احتمال مزمن شدن بیماری همراه است (۲۵).

در این مطالعه به منظور تخمین کلی وابستگی ژنتیکی سویه‌ها از روش‌های BOX A1R-PCR و ERIC-PCR استفاده شد. نتایج حاصل از BOX A1R-PCR وجود هشت خوشه و نتایج حاصل از ERIC-PCR وجود نه خوشه را در بین سویه‌ها نشان دادند. استفاده از این دو روش که به rep-PCR معروف هستند، در بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در سایر مطالعات نیز به چشم می‌خورد. Syrmis و همکاران در سال ۲۰۰۴ به بررسی جداسازی و شناسایی سویه‌های

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از خلط بیماران مبتلا به CF به روش rep-PCR پرداختند و بیان نمودند که این روش، سریع و دقیق بوده و تکرارپذیری خوبی دارد که ثابت می‌کند ابزار غربالگری قدرتمندی برای تیپ‌بندی *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران مبتلا به CF می‌باشد (۲۶). در مطالعه فریدی و همکاران در سال ۱۳۹۵ نیز تنوع ژنتیکی ۶۷ سویه بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش rep-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده وجود هفت خوشه در بین سویه‌ها بودند (۱۶). از سوی دیگر، خسروی و همکاران در سال ۱۳۹۶ تیپ‌بندی ژنتیکی ۶۶ سویه مقاوم به آنتی‌بیوتیک *سودوموناس آئروژینوزا* را که از نمونه‌های عفونی زخم و سوختگی جداسازی شده بودند، به روش ERIC-PCR انجام دادند. در این مطالعه هشت خوشه به دست آمد (۲۷).

نتایج این مطالعه نشان دادند که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در خوشه‌های مختلف، متفاوت است. به نحوی که میان خوشه‌های حاصل از BOX A1R-PCR در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، ایمی‌پنم و مروپنم (به ترتیب P=۰/۰۰۴، P=۰/۴۴ و P=۰/۰۱۲) و نیز میان خوشه‌های حاصل از ERIC-PCR در مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین تفاوت معناداری وجود داشت (P=۰/۰۰۹). با توجه به الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، این یافته در تأیید دقت بالای rep-PCR به ویژه BOX A1R-PCR در تیپ‌بندی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* قابل توجیه است.

همسو با این نتایج، Warren و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی ۴۹ سویه *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از ریه بیماران مبتلا به CF به روش rep-PCR پرداختند و سویه‌ها را از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک و نرخ جهش‌پذیری بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که نرخ جهش و احتمالاً انتقال افقی ژن‌ها در این سویه‌ها با توانایی آن‌ها در سازگاری با ریه بیماران مبتلا به CF ارتباط مستقیم دارد (۸).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان دادند که تنوع سویه‌های مورد بررسی هم در سطح فنوتیپی (الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شکل کلونی متفاوت) و هم در سطح ژنوتیپی (تنوع الگوی باندها ERIC-PCR و BOX A1R-PCR) وجود دارد. با توجه به مطالعات انجام شده و نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران CF مزمن در ایران عموماً قدرت موتاسیون دارد و احتمالاً با ایجاد جهش و نوترکیبی قادر به تطابق خود با بدن میزبان (که در این مطالعه ریه بیماران مبتلا به CF است) می‌باشد. بر مبنای نتایج می‌توان گفت که هایپرموتاسیون در *سودوموناس آئروژینوزا* می‌تواند مقاومت آنتی‌بیوتیکی را تشدید نموده و باعث تغییرات فنوتیپی شود. این تغییرات می‌تواند با ایجاد عفونت مزمن و حتی عفونت ثانویه در ریه بیماران مبتلا به CF همراه باشد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در قالب پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا انجام شده است.

References:

1. Heijerman H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. J Cyst Fibros 2005;49(Suppl 2):3-5. PMID: 15970469

2. Lutz L, Leão RS, Ferreira AG, Pereira DC, Raupp C, Pitt T, et al. Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients from two Brazilian cities. J Clin Microbiol 2013;51(3):927-30. PMID: 23303495

3. Martina P, Feliziani S, Juan C, Bettiol M, Gatti B, Yantorno O, et al. Hypermutation in *Burkholderia cepacia* complex is mediated by DNA mismatch repair inactivation and is highly prevalent in cystic fibrosis chronic respiratory infection. Int J Med Microbiol 2014;304(8):1182-91. PMID: 25217078

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

4. Montanari S, Oliver A, Salerno P, Mena A, Bertoni G, Tümmler B, et al. Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. J Microbiol 2007;153(Pt 5):1445-54. PMID: 17464058

5. Marvig RL, Johansen HK, Molin S, Jelsbak L. Genome analysis of a transmissible lineage of *Pseudomonas aeruginosa* reveals pathoadaptive mutations and distinct evolutionary paths of hypermutators. PLoS Genet 2013;9(9):e1003741. PMID: 24039595

6. Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, et al. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. J Bacteriol 2008;190(24):7910-7. PMID: 18849421

7. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(11):4062-70. PMID: 17876002

8. Warren AE, Boulianne-Larsen CM, Chandler CB, Chiotti K, Kroll E, Miller SR, et al. Genotypic and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* reveals signatures of secondary infection and mutator activity in certain cystic fibrosis patients with chronic lung infections. Infect Immun 2011;79(12):4802-18. PMID: 21930755

9. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs 2007;67(3):351-68. PMID: 17335295

10. Tang YW, Stratton CW, Tang YW. Advanced techniques in diagnostic microbiology. New York: Springer; 2013. Link

11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: informational supplement. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2018. Link

12. Ferroni A, Guillemot D, Moumile K, Bernede C, Le Bourgeois M, Waernessyckle S, et al. Effect of mutator *P. aeruginosa* on antibiotic resistance acquisition and respiratory function in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2009;44(8):820-5. PMID: 19598278

13. Dawson SL, Fry JC, Dancer BN. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. J Microbiol Methods 2002;50(1):9-22. PMID: 11943354

14. Brooks G, Butel J, Morse S, Brooks G, Butel J, Morse S. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology (LANGE Basic Science). New York: McGraw-Hill; 2004. Link

15. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J Roy Soc Med 2002;95(Suppl 41):22-6. PMID: 12216271

16. Faridi F, Javadpour S, Kargar M. REP-PCR genotyping and antibiogram pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shahid Mohammadi hospital, Bandar Abbas, Iran. Qom Univ Med Sci 2016;10(7):38-48. Link

17. Tabatabaee SA, Nariman S, Taghipour R. Antibiogram and genotype of *Pseudomonas aeroginosa* in cystic fibrosis. J Urmia Univ Med Sci 2013;24(3):184-92. Link

18. Pittman JE, Calloway EH, Kiser M, Yeatts J, Davis SD, Drumm ML, et al. Age of *Pseudomonas aeruginosa* acquisition and subsequent severity of cystic fibrosis lung disease. Pediatr Pulm 2011;46(5):497-504. PMID: 21194167

19. Rajabpour M, Arabestani MR, Yousefi Mashof R, Alikhani MY. 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. Link

20. Navaneeth BV, Sridaran D, Sahay D, Belwadi MR. A preliminary study on metallo-[beta]-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients. Indian J Med Res 2002;116:264. Link

21. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context 2018;7:212527. PMID: 29872449

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

22. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(2):479-87. PMID: 15673721

23. Hu YF, Liu CP, Wang NY, Shih SC. In vitro antibacterial activity of rifampicin in combination with imipenem, meropenem and doripenem against multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Infect Dis 2016;16(1):444. PMID: 27553962

24. Sader HS, Huband MD, Castanheira M, Flamm RK. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility results from four years (2012 to 2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring Program in the United States. Antimicrob Agents Chmother 2017;61(3):e02252-16. PMID: 28069652

25. Mandsberg LF, Ciofu O, Kirkby N, Christiansen LE, Poulsen H, Høiby N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(6):2483-91. PMID: 19332676

26. Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. J Med Microbiol 2004;53(Pt 11):1089-96. PMID: 15496385

27. 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):206-11. PMID: 27050792

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0