فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۲۱- ۲۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۰۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

اثر شرایط محیطی بر تغییر شکل *سودوموناس آئروجینوزا* و ارتباط آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران دچار سوختگی

محسن موقوفه‌ئی: کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، mohsenmoghoofei@yahoo.com
حسین فاضلی: دانشیار باکتری‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، h_fazeli@med.mui.ac.ir
فرخنده پورسینا: استادیار باکتری‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، poursina@med.mui.ac.ir
بهرام نصر اصفهانی: دانشیار میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، nasr@hlth.mui.ac.ir
شراره مقیم: دانشیار میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، moghim@med.mui.ac.ir
حمید واعظ: دکتری میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، vaezhamid84@gmail.com
شیما هادی‌فر: کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، aseman.shima@yahoo.com
منصور صدیقی: کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، mansour_sedighi@yahoo.com
حاجیه قاسمیان صفائی*: استاد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، ghasemian@med.mui.ac.ir

چکیده

مقدمه: *سودوموناس آئروجینوزا* یک باکتری گرم منفی هوازی و از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است. این باکتری در استرس‌های محیطی مانند کمبود مواد غذایی، تغییر اسیدیته، تغییر فشار اسمزی و آنتی‌بیوتیک‌ها تغییر ریخت‌شناسی داده و به شکل کوکوئید در می‌آید. در شکل کوکوئید به علت تغییر در پپتیدوگلیکان دیواره سلولی، لیپیدهای غشا و کاهش فعالیت متابولیک باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شود. با توجه به افزایش مرگ و میر در بیماران سوختگی و مسأله مهم مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سودوموناس آئروجینوزا* در این بیماران، برآن شدیم تا پژوهشی در مورد عوامل مؤثر بر تغییر شکل به کوکوئید که خود یک عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی است، انجام دهیم.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، از نمونه‌های زخم بیماران سوختگی (۸ نمونه که توسط متخصص عفونی از زخم بیماران گرفته شد) و سویه استاندارد ۲۷۸۵۳ استفاده شد. نمونه‌ها توسط آزمون‌های بیوشیمیایی و روش PCR با پرایمرهای *16SrDNA* تایید شدند. سپس، نمونه‌ها در استرس‌های قحطی مواد غذایی و آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. شکل باکتری‌ها هر روز توسط میکروسکوپ دیجیتال دی پی ایکس (شرکت المپیوس ژاپن) به مدت ۶۰ روز بررسی شد. پس از القا فرم کوکوئید، زنده بودن باکتری توسط فلوسایتومتری تایید شد.

نتایج: باکتری در شرایط آنتی‌بیوتیک از روز پنجم و در استرس‌های دیگر از روز ۱۰ شروع به تغییر شکل کرد. تغییر ابتدا به شکل باسیل‌های کشیده، سپس به شکل U و در نهایت، به شکل کوکوئید دیده شد. در نمونه با استرس ایمیپنم و مروپنم نتیجه مشابه بود و غلظت القا کننده آنتی‌بیوتیک ۲ میکروگرم در لیتر و غلظت کشندگی این دو آنتی‌بیوتیک بالاتر از ۴ میکروگرم در لیتر بود. نتیجه سویه استاندارد برای ایمیپنم و مروپنم مشابه با سویه‌های بالینی بود. در نمونه‌های کلینیکی در استرس آمیکاسین غلظت القا کننده آنتی‌بیوتیک ۴ میکروگرم بر لیتر و غلظت کشندگی بیشتر از ۸ بود. در نمونه استاندارد در استرس آمیکاسین غلظت القا کننده آنتی‌بیوتیک ۲ میکروگرم بر لیتر و غلظت کشندگی بیشتر از ۴ بود.

بحث و نتیجه‌گیری: تغییر شکل باکتری از باسیل به کوکوئید در نتیجه استرس‌هایی که در بدن بیمار به این باکتری وارد می‌شود، می‌تواند به مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک منجر شده و عواقب وخیمی را برای بیمار در بر داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروجینوزا*، فرم کوکوئید، بیماران سوختگی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا [1] با تولید عوامل حدت مختلف می‌تواند موجب انواع بیماری شامل باکتریمی، اندوکاردیت، عفونت دستگاه ادرار، دستگاه تنفسی، سیستم عصبی مرکزی، گوش، چشم، استخوان، مفاصل و پوست شود (۱). این باکتری به عنوان سومین عامل در عفونت‌های بیمارستانی و نخستین عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های سوختگی بیمارستان‌ها مطرح است (۲ و ۳). سپتی سمی ناشی از این باکتری به عنوان یک عارضه جدی ناشی از عفونت‌های سوختگی مطرح بوده و خطر این عارضه متناسب با درجه سوختگی افزایش می‌یابد (۴ و ۵). این باکتری عامل اصلی مرگ و میر در بخش سوختگی بیمارستان است (۶). امروزه شاهد این مسأله هستیم که با وجود اثرگذاری آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان این باکتری در شرایط آزمایشگاهی، همیشه نتیجه مطلوب و مشابه این شرایط روی بیمار حاصل نمی‌شود و این مسأله مربوط به شرایط فیزیولوژیک باکتری بوده و خود متأثر از شرایط محیطی است (۷). توانایی این باکتری برای رشد در محیط‌های با حداقل مواد غذایی و داشتن مقاومت طبیعی به عوامل ضدعفونی کننده وآنتی‌بیوتیک‌ها باعث می‌شود که این باکتری از وسایل پزشکی و محیط‌های مرطوب بیمارستان‌ها جداسازی شود (۸). در طی عفونت، *سودوموناس آئروجینوزا* باید در برابر تغییرات محیطی از جمله تغییر در دما، اسیدیته [2]، قدرت یونی، حد واسط‌های فعال اکسیژن و آنتی بادی مقاومت کرده و زنده بماند (۹). باکتری در اثر استرس‌هایی مانند کمبود موادغذایی، تغییراسیدیته، تغییر دما، کاهش اکسیژن، افزایش فشار اسمزی و آنتی‌بیوتیک‌ها ابتدا به شکل U و سپس، به شکل کوکوئید در می‌آید. بنابراین، باکتری به شکل‌های باسیلی، U شکل وکوکوئید دیده می‌شود (۱۰ و ۱۱). درطی تبدیل به شکل کوکوئید اندازه سلول کاهش می‌یابد که نتیجه انقباض غشای سیتوپلاسمی وکاهش در حجم فضای پری پلاسمیک است، همچنین، DNA (دئوکسی‌ریبونوکلئیک‌اسید [3]) فشردگی پیدا می‌کند (۱۲ و ۱۳). مطالعات مختلف نشان داده که مجاورت باکتری با غلظت‌های زیر حداقل غلظت مهار کننده رشد [4] آنتی‌بیوتیک‌ها بر چسبندگی، هیدروفوب سطحی سلول و تحرک باکتری اثر می‌گذارند (۱۴ و ۱۵). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که وقتی باکتری از شکل باسیل به کوکوئید تغییر شکل می‌دهد مقاومت آن‌ها نسبت به پراکسید هیدروژن، فشاربالای اسمزی، شوک حرارتی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، عوامل شیمیوتراپی و عوامل احیاکننده افزایش می‌یابد. این مقاومت می‌تواند به علت تغییرات در اتصالات متقاطع دیواره سلولی و یا کاهش فعالیت‌های متابولیک باشد (۱۰، ۱۶- ۱۸). در تبدیل شکل باسیل به شکل کوکوئید ژن‌های متفاوتی دخالت دارند ازجمله ژن *rpoS* که عامل‌های سیگمای متفاوتی کد می‌کند و باعث زنده ماندن *سودوموناس آئروجینوزا* در شرایط استرس می‌شوند (۱۹). ژن *rpoS* یک پروتئین به نام عامل سیگما (RpoS) را کد می‌کند که یک عامل عمومی رونویسی بوده و در تنظیم ژن‌های درگیر در فاز ایستایی [5] دخالت دارد. این ژن دارای عملکردهای بسیار مهمی برای باکتری از جمله: کنترل ژن‌های درگیر در تحمل فشار اسمزی، کمبود مواد غذایی و گرما، کنترل تولید اگزوتوکسین A، الاستاز، پیوسیانین، پروتئاز، آلژینات، تشکیل بیوفیلم و تغییر در پوشش سلولی و شکل است (۱، ۹ و ۲۰). با توجه به افزایش مرگ و میر در بیماران سوختگی و مسأله مهم مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سودوموناس آئروجینوزا* در این بیماران برآن شدیم تا پژوهشی در مورد عوامل مؤثر بر تغییر شکل از باسیل به کوکوئید انجام دهیم.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و شرایط کشت: در پژوهش حاضر، از ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* به دست آمده از بیماران سوختگی بیمارستان امام موسی کاظم (ع) اصفهان و سویه استاندارد ۲۷۸۵۳ تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. سویه‌ها روی محیط سیتریمید آگار [۶] کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه باکتری‌های رشد یافته با رنگ آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند اکسیداز، اکسیداتیو فرمنتاتیو [۷] و رشد در ۴۲ درجه و با پرایمرهای *16SrDNA* تایید شدند.

آنتی بیوگرام: در پژوهش حاضر، از آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم، مروپنم و آمیکاسین استفاده شد.

حداقل غلظت مهار کننده رشد [۸]: میزان حداقل غلظت مهاری برای آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و مروپنم به روش آزمون E انجام شد. نمونه‌ها باکدورت نیم مک فارلند تهیه و +- محیط مولر هینتون آگار پخش شد. روی هر پلیت کشت داده شده یک نوار آزمون E قرار داده شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه ثبت شد.

PCR و پرایمر مورد استفاده: روش واکنش PCR (زنجیره ای پلیمراز [۹]) برای تایید سویه‌های جداسازی شده در سطح گونه به عنوان *سودوموناس آئروجینوزا* انجام شد. پرایمر مورد استفاده مربوط به قسمت بین ژن‌های *16SrRNA* و *23SrRNA* بوده و توالی پرایمر به شکل زیر است (۲۱):

PA1 TCC AAA CAA TCG TCG AAA GC
PA2 CCG AAA ATT CGC GCT TGA AC

ناحیه‌ای که این پرایمر تکثیر می‌کند شامل ۱۸۱ جفت باز است. از سویه *سودوموناس آئروجینوزا* استاندارد ۲۷۸۵۳ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخلوط واکنش PCR به شکل زیر است:

۰/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR master mix که خود شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۶ میکرولیتر دئوکسی‌نوکلئوتیدتری‌فسفات [۱۰] ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکو مول و ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد به ازای هر میکرولیتر) بود اضافه شد و حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. زمان‌های چرخه‌های تکثیر عبارتند از: زمان ذوب ابتدایی ۴ دقیقه، ذوب ۱ دقیقه، اتصال ۴۵ ثانیه و گسترش ۱ دقیقه و تعداد چرخه‌ها ۴۰ چرخه بود. الکتروفورز محصول PCR با استفاده از DNA لدر [۱۱] (فرمنتاز [۱۲]) در ژل آگاروز ۱/۵ درصد به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۵ انجام شد و با استفاده از گرین ویوور [۱۳] در دستگاه آشکار ساز ژل [۱۴] مشاهده شد.

القای فرم کوکئید: کلونی‌های تازه ۲۴ ساعته (۸ نمونه) از *سودوموناس آئروجینوزا* برداشته و شکل باسیل آن‌ها به‌وسیله رنگ آمیزی گرم تایید شد. سپس، درون محیط عصاره قلب مغز [۱۵] تلقیح شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در شرایط استرس‌های مختلف شامل کمبود مواد غذایی و آنتی‌بیوتیک قرار داده شدند. به لوله‌های با استرس آنتی‌بیوتیکی غلظت‌های مختلف (MIC, 1/2 MIC and 2×MIC) آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم، مروپنم و آمیکاسین اضافه شد. یک لوله بدون آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل قرار داده شد. نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت رشد، تا ۶۰ روز نگهداری شد. هر روز ریخت‌شناسی آن‌ها با رنگ آمیزی گرم و با میکروسکوپ (دیجیتال دی پی ایکس شرکت المپیوس

ژاپن [۱۶]) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ بررسی شد. زمانی که بیش از ۹۰ درصد باکتری‌ها به فرم کوکوئید تبدیل شدند زنده ماندن آن‌ها بررسی شد. همچنین، با این میکروسکوپ اندازه شکل باسیل و کوکوئید نیز اندازه‌گیری شد. درصد شکل‌های کوکوئید به شکل شمارش ۱۰۰ باکتری در ۳ میدان دید برای هر اسمیر اندازه‌گیری شد. زمانی که کوکوئیدها ۹۵ درصد کل سلول‌های باکتری را شامل شدند آزمایش قابلیت زنده بودن [۱۷] انجام شد.

یکپارچگی غشا و سنجش زنده بودن سلول: این کار با روش فلوسایتومتری و مطابق مراحل زیر انجام شد:

۱- پس از تهیه سوسپانسیون باکتری، ۳ مرتبه با فسفات بافر سالین [۱۸] (۵ میلی لیتر با اسیدیته ۸) و سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه شستشو شد.

۲- سپس، به باکتری‌های رسوب کرده ۱ میکرولیتر رنگ پروپیدیوم یودید [۱۹] اضافه و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد.

۳- سوسپانسیون سلولی با فلوسایتومتری (فاکس کالیبور شرکت بکتون دیکنسون [۲۰]) با طول موج ۴۸۸ نانومتر تحلیل شد.

۴- با این دستگاه ۱۵۰ تا ۵۰۰ سلول در ثانیه شمارش شد.

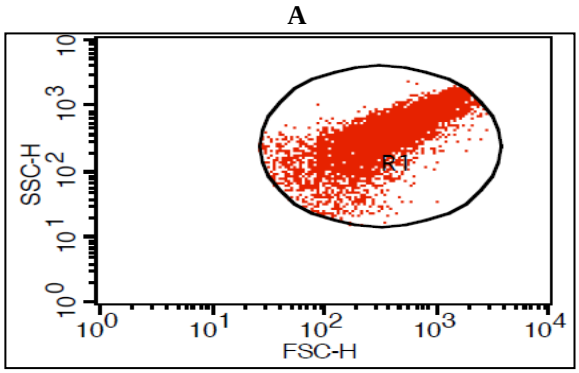
۵- داده‌ها بر اساس شمارش ۱۰ هزار سلول بر طبق FSC، SSC و فلورسانس قرمز اندازه‌گیری شد.

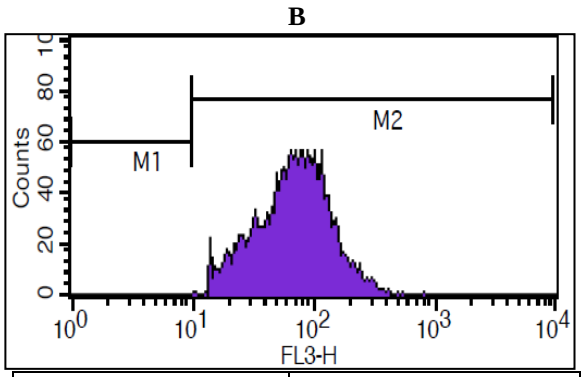
یک سوسپانسیون سلولی از باکتری‌های با کشت تازه به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از یک سوسپانسیون باکتری‌های با کشت تازه به عنوان کنترل مثبت واز یک سوسپانسیون باکتری کشته شده با حرارت به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

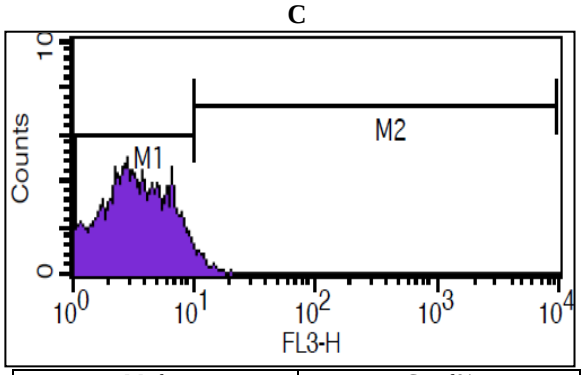
در روز اول که باکتری‌ها در شرایط استرس قرار داده شدند از آن‌ها لام گرفته و با میکروسکوپ شکل آن‌ها بررسی شد. کمابیش ۱۰۰ درصد به شکل باسیل بودند (شکل ۱: الف). سپس، هر روز شکل آن‌ها بررسی شد و در نمونه‌های با استرس مواد غذایی در روز ۱۰ و در نمونه‌های با استرس آنتی‌بیوتیک پس از ۷۲ ساعت باسیل‌های بسیار کشیده و شکل‌های U و خمیده دیده شد. در روز ۱۶ استرس غذایی باکتری به شکل کوکوئید دیده شد (شکل ۱: ب). در روز ۳۹ استرس غذایی و روز ۸ استرس آنتی‌بیوتیک کمابیش همه نمونه‌ها به شکل کوکوئید تبدیل شده بودند (شکل ۱: ج).

شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی از رنگ آمیزی گرم *سودوموناس آئروجینوزا* در مراحل مختلف شکلی. الف) شکل باسیل باکتری پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون ب) شکل باسیل، U شکل و باسیل کشیده ج) شکل کوکوئید باکتری پس از ۸ روز در استرس آنتی‌بیوتیک



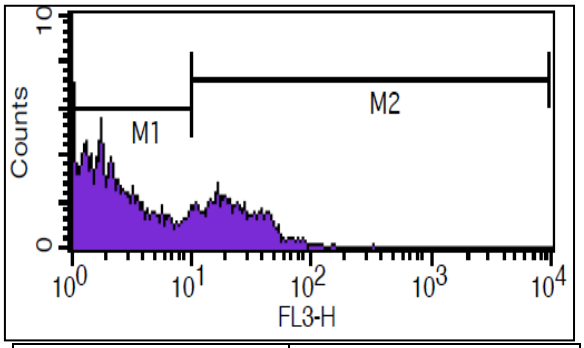


Marker	Gated%
All	100. 00
M_1	0. 00
M_2	100. 00

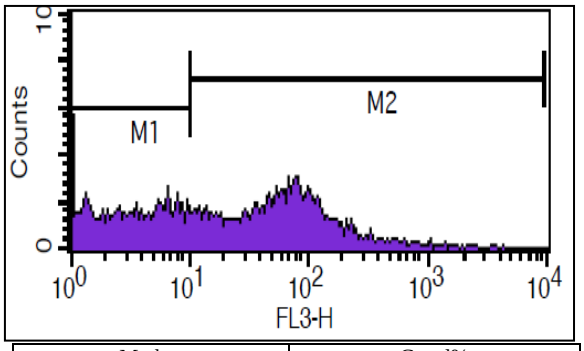


Marker	Gated%
All	100. 00
M_1	98. 20
M_2	1. 91

شکل ۲- A) Light scatter of gated سلول‌های *سودوموناس آئروجینوزا* B) نسبت جذب پروپیدیوم آیودید در نمونه کنترل مثبت *سودوموناس آئروجینوزا* که باکتری‌ها کشته شده اند (جذب بالا در ناحیه M_2) C) نسبت جذب پروپیدیوم آیودید در نمونه کنترل منفی که باکتری به فرم باسیل و زنده است (جذب بالا در ناحیه M_1). M_1 درصد سلول‌های زنده و M_2 درصد سلول‌های مرده است.



Marker	Gated%
All	100. 00
M_1	73. 97
M_2	26. 23



Marker	Gated%
All	100. 00
M_1	55. 05
M_2	45. 10

شکل ۳- میزان جذب متفاوت پروپیدیوم آیودید در ۲ نمونه مختلف. در نمونه اول مدت زمان استرس کمتر بوده و در نتیجه تعداد سلول‌های زنده بیشتر است (M_1). در نمونه دوم مدت زمان استرس بیشتر بوده و در نتیجه تعداد سلول‌های مرده بیشتر است (M_2).

در نمونه کنترل که به روش گرم رنگ آمیزی شده بود نشان داد که تمام باکتری‌ها به شکل باسیل بودند. در نمونه‌های در استرس آنتی‌بیوتیک میزان غلظت آنتی‌بیوتیکی که موجب القای شکل کوکوئید یا از بین رفتن شکل کوکوئید شد به ترتیب زیر بود: در نمونه در استرس ایمیپنم و مروپنم نتیجه مشابه بود و غلظت القا کننده آنتی‌بیوتیک ۲ میکروگرم در لیتر و غلظت کشندگی این دو آنتی‌بیوتیک بالاتر از ۴ میکروگرم در لیتر بود. نتیجه سویه استاندارد برای ایمیپنم و مروپنم مشابه با سویه‌های بالینی بود.

در نمونه‌های کلینیکی با استرس آمیکاسین غلظت القا کننده آنتی‌بیوتیک ۴ میکروگرم بر لیتر و غلظت کشندگی بیشتر از ۸ بود. در نمونه استاندارد با استرس آمیکاسین غلظت القا کننده آنتی‌بیوتیک ۲ میکروگرم بر لیتر و غلظت کشندگی بیشتر از ۴ بود. زنده بودن نمونه‌ها در شکل کوکوئید با روش فلو سایتومتری تایید شد (شکل ۲ و ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت این باکتری در بیماران بستری به عنوان یک خطر جدی به شمار می‌رود به‌طوری که در موارد سپتی سمی با *سودوموناس آئروجینوزا* با وجود درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، در بیماران دچار سوختگی میزان مرگ و میر به ۵۰ درصد می‌رسد (۲۲). هدف از انجام این پژوهش، افزایش دانش درباره اثر عوامل محیطی روی القای تغییر شکل *سودوموناس آئروجینوزا* است. شکل هر باکتری بیشتر با پپتیدوگلیکان آن تعیین می‌شود که جزو اصلی دیواره سلولی است (۲۳). برخی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند ایمیپنم که توانایی اتصال به پروتئین‌های متصل شومنده به پنی سیلین را دارند موجب تغییر شکل باکتری می‌شوند (۱۴). یکی از اصلی‌ترین رفتارهای مشاهده شده در باکتری‌های گرم منفی با شرایط استرس محیطی کاهش اندازه سلول و تغییر شکل باسیل به کوکوئید است (۱۰).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هم کمبود مواد غذایی و هم آنتی‌بیوتیک موجب القای شکل کوکوئید در *سودوموناس آئروجینوزا* شدند. یکی از نتایج مهم پژوهش حاضر این بود که هر سه آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت مهاری موجب القای شکل کوکوئید شدند.

در مطالعه سفالی [21] و همکاران در ایتالیا سویه *سودوموناس آئروجینوزا* از روز ۹ شروع به تغییر شکل و تبدیل به شکل کوکوئید کرده است. در پژوهش حاضر سویه‌های با استرس مواد غذایی و دما از روز ۱۶ و سویه‌های با استرس آنتی‌بیوتیک از روز ۵ شروع به تغییر شکل و تبدیل به شکل کوکوئید کردند. علت این تفاوت می‌تواند اختلاف در ویژگی‌های سویه مورد مطالعه، نوع و زمان استرس و نوع محیط کشت مورد استفاده باشد (۲۴). در مطالعه فقری [22] و همکاران در ایران روی *هلیکوباکتر پیلوری* پس از ۳ روز استرس آنتی‌بیوتیکی باکتری شروع به تبدیل به شکل کوکوئید کرد. در پژوهش حاضر این تغییر از روز ۵ آغاز شد. علت این اختلاف می‌تواند میزان تحمل متفاوت باکتری‌ها در برابر استرس، مقاومت ذاتی آن‌ها به آنتی‌بیوتیک و نوع آنتی‌بیوتیک مورد استفاده باشد (۲۵). بسنارد [23] و همکاران با مطالعه روی *کمپیلوباکتر ژژونی* نشان دادند که این باکتری با استرس مواد غذایی در روز ۱۴ شروع به تغییر شکل کرد (۲۶). روش‌های مختلفی برای سنجش زنده بودن شکل کوکوئید وجود دارد. در پژوهش حاضر از روش فلوسایتومتری به علت سریع بودن، آسان بودن و معتبر بودن استفاده شد (۲۴).

این باکتری به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در محیط‌های بیمارستانی مطرح است، بنابراین، باید با برنامه‌ای دقیق و هدفمند از بروز چنین سویه‌های مقاومی جلوگیری کرد(۲۷). از آنجا که *سودوموناس آئروجینوزا* در زخم بیماران دچار سوختگی در معرض استرس‌های مختلف از جمله کمبود مواد غذایی و آنتی‌بیوتیک قرار می‌گیرد و ممکن است به شکل کوکوئید تبدیل شود، دقت در تجویز غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها برای جلوگیری از القای شکل کوکوئید می‌تواند در جلوگیری از مقاومت آنتی‌بیوتیکی و درمان بیماران مفید باشد. مطالعه روی شکل کوکوئید از نظر بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تعیین نوع و دوز آنتی‌بیوتیک برای پیشگیری از ایجاد شکل کوکوئید ضروری است.

References

(1) Iversen BG., Brantsaeter AB., Aavitsland P. Nationwide study of invasive *Pseudomonas aeruginosa* infection in Norway: importance of underlying disease. *The Journal of infection* 2008; 57 (2): 139- 46.

(2) Bert F., Maubec E., Bruneau B., Berry P., Lambert- Zechovsky N. Multi- resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 1998; 39 (1): 53- 62.

(3) Rastegar Lari AR., Alaghehbandan R., Akhlaghi L. Burn wound infections and antimicrobial resistance in tehran., iran: an increasing problem. *Annals of burns and fire disasters* 2005; 18 (2): 68- 73.

(4) De Vos D., Lim A Jr., Pirnay JP., Struelens M., Vandenvelde C., Duinslaeger L., et al.. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes. oprI and oprL. *Journal of clinical microbiology* 1997; 35 (6): 1295- 9.

(5) Pirnay J- P., De Vos D., Duinslaeger L., Reper P., Vandenvelde C., Cornelis P., et al. Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid `real- time' polymerase chain reaction. *Critical Care* 2000; 4 (4): 255- 62.

(6) Bahar MA., Jamali S., Samadikuchaksaraei A. Imipenem- resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo- beta- lactamase gene bla (VIM) in a level I Iranian burn hospital. *Burns* 2010; 36 (6): 826- 30.

(7) Murakami K., Ono T., Viducic D., Kayama S., Mori M., Hirota K., et al. Role for rpoS gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS microbiology letters* 2005; 242 (1): 161- 7.

(8) Murakami K., Ono T., Viducic D., Kayama S., Mori M., Hirota K., et al. Role for rpoS gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 242 (1): 161- 7.

(9) Marlo Firme HK., Lee C., Song D. RpoS Contributes to Variations in the Survival Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in Response to Ciprofloxacin. *Journal of Experimentall Microbiology and Immunology (JEMI)* 2010; 14: 21- 7.

(10) Cefalì E., Patanè S., Arena A., Saitta G., Guglielmino S., Cappello S., et al. Morphologic variations in bacteria under stress conditions: *Near- field optical studies. Scanning* 2002; 24 (6): 274- 83.

(11) Oliver JD. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology* 2004; 1-8.

(12) Sachidanandham R., Yew- Hoong Gin K., Laa Poh C. Monitoring of active but non- culturable bacterial cells by flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering* 2005; 89 (1): 24- 31.

(13) Elabed H., Bakhrouf A., Hamza R., Azaiez M., Gaddour K. Evidence of the adaptive response in *Pseudomonas aeruginosa* to 14 years of incubation in seawater. *Annals of Microbiol* 2012; 62 (4): 1385- 94.

(14) Fonseca AP., Sousa JC. Effect of antibiotic- induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states. *Journal of Applied Microbiology* 2007; 103 (5): 1828- 37.

(15) Rowan NJ. Viable but non- culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends in Food Science & Technology* 2004; 15 (9): 462- 7.

(16) McDougald D., Rice SA., Weichart D., Kjelleberg S. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* 1998; 25 (1): 1- 9.

(17) Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*

2010; 34 (4): 415- 25.

(18) Kana BD., Mizrahi V. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2010; 58 (1): 39- 50.

(19) Jørgensen F., Bally M., Chapon- Herve V., Michel G., Lazdunski A., Williams P., et al. RpoS- dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 1999; 145 (4): 835- 44.

(20) Sang- jin Suh ls- S., Donald E. Woods., Daniel J. Hassett., Susan E. H. west., Dennis E. Ohman. Effect of rpoS Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 1999; 181:3890- 7.

(21) Tyler SD., Strathdee CA., Rozee KR., Johnson WM. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic *pseudomonads* on the basis of the sequencing of genes coding for 16S- 23S rRNA internal transcribed spacers. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1995; 2 (4): 448- 53.

(22) Matthew R., Fogle BS., John A. Griswold M. D., Jeffrey W. Oliver M. D., Abdul N., Hamood Ph. D. Anti- ETA Igg Neutralizes The Effects of *Pseudomonas Aeruginosa* Exotoxin A. *Journal Of Surgical Research* 2002; 106: 86- 98.

(23) Dworkin J. Form equals function? Bacterial shape and its consequences for pathogenesis. *Molecular Microbiology* 2010; 78:792- 5.

(24) Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*. 2005; 43 (1): 93- 100.

(25) Faghri J., Poursina F., Moghim S., Esfahani HZ., Esfahani BN., Fazeli H., et al. Morphological and Bactericidal Effects of Different Antibiotics on *Helicobacter pylori*. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2014; 7 (1): 1- 7.

(26) Besnard V., Federighi M., Cappelier J. Evidence of Viable But Non- Culturable state in Listeria monocytogenes by direct viable count and CTC- DAPI double staining. *Food microbiology* 2000; 17 (6): 697- 704.

(27) Sedighi M., Ghasemian safaie H., Vaez H., Moghoofeie M., Hadifar SH., Oryan G., et al. Detection of blaSPM-1 metallo-β-lactamase gene in Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Isfahan hospitals. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 13 (1): 1- 14.

---

[1]- *Pseudomonas aeruginosa*
[2]- pH
[3]- Deoxyribonucleic acid
[4]- sub Minimum Inhibitory Concentration
[5]- Stationary state
[6]- Cetrimide agar
[7]- Oxidative-fermentative
[8]- Minimum Inhibitory Concentration
[9]- Polymerase chain reaction
[10]- Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)
[11]- DNA Ladder
[12]- Fermentase
[13]- Green viewer
[14]- Gel documentation
[15]- Brain-heart infusion
[16]- Digital DP 72-BX 51, Olympus, Japan
[17]- Viability
[18]- Phosphate Buffer Saline
[19]- Propidium Iodide(PI)
[20]- FACSCalibur, Beckton Dickinson
[21]- Cefali
[22]- Faghri
[23]- Besnard

Effects of environmental conditions on the morphologic change of *Pseudomonas aeruginosa* and its association with antibiotic resistance in burn patients

Mohsen Moghoofei
M.Sc of Medical microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, mohsenmoghoofei@yahoo.com
Hossein Fazeli
Associated Professor of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, h_fazeli@med.mui.ac.ir
Farkhonde Poursina
Assistant Professor of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, poursina@med.mui.ac.ir
Bahram Nasr-Esfahani
Associated Professor of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, nasr@hlth.mui.ac.ir
Sharareh Moghim
Associated Professor of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, moghim@med.mui.ac.ir
Hamid Vaez
Ph.D of Microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, vaezhamid84@gmail.com
Shima Hadifar
M.Sc of Medical microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, mohsenmoghoofei@yahoo.com
Mansour Sedighi
M.Sc of Medical microbilogy, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, mohsenmoghoofei@yahoo.com
Hajei Ghasemian Safaie *
Professor of Microbilogy, Isfahan Univercity of Medical Sciences, Iran, ghasemian@med.mui.ac.ir

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an aerobic gram-negative bacteria, which causes hospital infections. Bacteria under stress, such as lack of food, pH and osmotic pressure change and antibiotic stress transforms its morphology to coccoid form. In the bacill form due to changes in the peptidoglycan cell wall, membrane lipids and decreased metabolic activity, bacteria resistant to antibiotics. Due to an increase in mortality in burn patients and important problem of antibiotic resistance in *P.aeruginosa* the researcher decided to study the factors affecting on morphologic change to coccoid form.

Materials and methods: In this study *P.aeruginosa* strains obtained from clinical samples of burned patients (8 samples were taken from the wound by Infectious Disease Specialist) and standard strain ATCC 27853 were used. Samples were confirmed by biochemical tests and PCR by 16srDNA primer. Then bacteria were put under lack of food and antibiotic stress invitro. After that bacterial morphology was examined on different days by digital DP 72-BX 51 microscope to 60 days. After induction coccoid forms, bacterial viability was confirmed by flow cytometry.

Results: Bacteria begin to change morphology from 5 days for antibiotic stress and 10 days for other stress. Changing morphology was initially elongate bacilli, U shape and finally the coccoid form was seen.

Discussion and conclusion: Changing morphology of bacilli to coccoid bacteria that are the result of stress on the bacteria which enter the body can lead to bacterial resistance to antibiotics and have grave consequences for the patient.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Coccoid form, Burn patients

* Corresponding author
Received: June 30, 2014/ **Accepted:** December 31, 2014