فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۵، جلد ۱۴، شماره۴، پاییز ۱۴۰۰، صفحه۳۵ تا ۴۵
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی باکتری شکارگر باکتریووراکس استولپی (Bacteriovorax stolpii) بر بهبود زخم سوختگی عفونی شده با سودوموناس آئروجینوزا در موش بزرگ آزمایشگاهی

DOR:

محمد شهباززاده[۱]، **الهام معظمیان**[۱]، علیرضا رفعتی[۲]، مسعود فردین[۳]
۱-گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز.ایران.
۲-گروه فارماکولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سروستان، سروستان، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، اردبیل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۲۲ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۷/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: باکتری مقاوم به دارو یکی از اصلی‌ترین عوامل مرگ‌ومیر براثر سوانح سوختگی می‌باشد. باکتری باکتریووراکس استولپی مثل سایر شکارگرها به فضای پری پلاسمی باکتری‌های گرم منفی حمله کرده و موجب از بین رفتن آن ها می‌شود هدف از پژوهش حاضر بررسی باکتری شکارگر باکتریووراکس استولپی بر درصد بهبود زخم سوختگی عفونی شده با سودوموناس آئروجینوزا در موش بزرگ آزمایشگاهی بود.

روش کار: ۳۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی آلبینو ان ماری بعد از ایجاد زخم سوختگی به صورت ۵ تایی در گروه های کنترل مثبت، منفی، تیمار جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و باکتریووراکس استولپی به صورت تصادفی تقسیم شد و به جز گروه کنترل منفی تمامی گروه ها به وسیله ٤ جدایه سودوموناس مقاوم به چند دارو عفونی شدند. بعد از درمان با باکتری و آنتی بیوتیک کلونی های زخم به صورت یک روز در میان و اندازه گیری مساحت زخم هم در طی ۲۰ روز گزارش شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از شمارش کلونی ها نشان داد که باکتری باکتریووراکس استولپی در زخم های عفونی در طی ۲۱ روز در مقایسه با سایر گروه ها میزان باکتری ها را به صورت معنی داری می کاهند و این کاهش بهتر از عملکرد آنتی بیوتیک های جنتامایسین و سیپروفلوکساسین است و اندازه گیری مساحت زخم در طی ۲۰ روز نیز نشان داد که استفاده از باکتری شکارگر باعث کاهش مساحت زخم در موش های سوخته نسبت به گروه های کنترل می شود. بررسی بافت شناسی زخم های حاصل نشان داد که باکتری شکارگر باعث کاهش التهاب، افزایش فیبروبلاست ها و افزایش کلاژن بافتی نسبت به گروه کنترل شده است.

نتیجه گیری: باکتریووراکس استولپی می تواند روند درمان را در آلودگی های مقاوم به دارو تسریع کند.

واژه‌های کلیدی: باکتری شکارگر، باکتریووراکس استولپی، سوختگی، مقاومت دارویی.

مقدمه

عفونت ناشی از سوختگی یکی از اصلی‌ترین عوامل مرگ‌ومیر براثر سوانح سوختگی می‌باشد(۷). ۶۸ درصد مرگ‌های بیمارستانی ناشی از سوختگی درنتیجه عفونی شدن زخم و سپتیسمی بوده است(۱۴). بر اساس آمار از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۱، در سراسر جهان ۱۱ میلیون سوختگی به مراقبت پزشکی نیاز داشته و از این تعداد ۳۰۰۰۰۰ نفر جان خود را ازدست‌داده‌اند(۲۱). بر همین اساس بعد از تصادفات موتوری، پرت شدن از ارتفاع و خشونت، سوختگی چهارمین عامل مرگ‌ومیر می‌باشد حدود ۹۰٪ سوختگی‌ها در کشورهای درحال‌توسعه رخ می‌دهد و علت آن تا حدودی تجمع بیش‌ازحد و شرایط آشپزی غیر ایمن است به‌طورکلی ۶۰٪ سوختگی‌های منجر به مرگ

در جنوب شرق آسیا رخ می‌دهد و نرخ آن ۱۱/۶ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد(۲۳) در کشورهای توسعه‌یافته نرخ مرگ‌ومیر ناشی از سوختگی در مردان دو برابر زنان است. این میزان به‌احتمال‌زیاد به دلیل مشاغل پرخطر و نیز فعالیت‌های ریسک‌پذیر آن‌هاست(۲۹). در بسیاری از کشورهای درحال‌توسعه نرخ مرگ‌ومیر زنان براثر سوختگی دو برابر مردان است و عمدتاً با حادثه‌های به‌وجود آمده در آشپزخانه یا خشونت‌های خانوادگی ارتباط دارد نرخ مرگ‌ومیر ناشی از سوختگی کودکان در کشورهای درحال‌توسعه بیش از ده برابر نرخ مرگ‌ومیر ناشی از سوختگی کودکان در کشورهای توسعه‌یافته است(۱۹). به‌طور کل، مرگ‌ومیر ناشی از سوختگی یکی از پانزده علت اصلی مرگ‌ومیر در کودکان است از دهه ۸۰ تا سال ۲۰۰۴ اکثر کشورها شاهد کاهش نرخ سوختگی‌های کشنده و به‌طورکلی سوختگی بوده‌اند(۲۱). تنوع زیادی از باکتری‌ها را می‌توان از زخم سوختگی جدا کرد. استافیلوکوکوس، سودوموناس‌آئروجینوزا، استنوباکتر، انتروباکترکلواک، پروتئوس و اشریشیاکلی از جمله این باکتری‌ها می‌باشند(۱۲). باکتری سودوموناس‌آئروجینوزا در اکثر باکتریمی های ناشی از سوختگی به‌وجود می‌آید و علیرغم پیشرفت‌هایی که در علم پزشکی صورت گرفته است، هنوز مرگ‌ومیری به میزان ۸۰ درصد در این بیماران دیده می‌شود(۸). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت های زخم های سوختگی یکی از دلایل اصلی شکست درمان در سوختگی‌ها است(۳۳). استفاده گسترده و نابجا از آنتی‌بیوتیک‌ها گسترش مقاومت باکتریایی را تسریع کرده که از نتایج آن بی اثر شدن درمان و تهدید حیات بیمار است(۹). وجود پمپ‌های افلاکس، کسب ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم و نفوذپذیری پایین پوشش سلول از طریق لایه آلژیناتی و لیپوپلی‌ساکاریدی از علل این حساسیت کم به شمار می‌آیند(۱۶). اکثر باکتری های جدا شده از عفونت های سوختگی مقاوم به چند دارو هستند. مقاومت چند دارویی با کسب جهش‌های مختلف و یا انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی گسترش می‌یابد(۵). استفاده از پروبیوتیک ها و باکتری های زنده در سال های اخیر در بهبود برخی از عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک گزارش شده است(Ottaviani et al., 2020) شکارگرها باکتری‌های کوچکی هستند که به صورت غیر اختصاصی به فضای پری پلاسمی باکتری‌های گرم منفی حمله کرده و با تکثیر خود در این ناحیه باعث از بین رفتن باکتری طعمه خود می‌شوند(۳۱). شکارگرها به‌طور وسیعی در اکوسیستم‌های خاکی، آب شیرین و دریایی شامل دهانه رودها، سواحل دریا و اقیانوس‌ها، رودخانه‌ها، فاضلاب‌ها، حوضچه‌های پرورش ماهی، جریان آب‌های آبیاری و مخازن آبی ساخت بشر توزیع‌شده‌اند(۲۷). شکارگرها از آبشش خرچنگ، رسوبات، سطوح زیر آب، خاک‌ها، مزارع برنج و ریزوسفر گیاهان جداسازی شده‌اند. هم چنین آن‌ها را می‌توان از مدفوع حیوانات جداسازی کرد و به عنوان جمعیت غالب در زالوی هیرودووربنا کشف شده‌اند. شکارگرها به بیوفیلم‌هایی که در سکونتگاه‌های آبی تشکیل می‌شوند مهاجرت می‌کنند و در شرایط آزمایشگاهی، به‌طور مؤثری بیوفیلم‌ها را حذف می‌کنند. شوری و به میزان کمتری طیف میزبانی، فاکتورهای اکولوژیکی هستند که می‌توانند در توصیف نیای شکارگرها استفاده شوند(۳۰). ارزیابی فراوانی نسبی شکارگرها بر اساس توالی ژن S rRNA ۱۶در طیف وسیعی از محیط‌ها صورت گرفته است این مطالعات نشان داده اند که شکارگرها به‌طور متوسط حدود ۰/۲٪ کل باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند. به‌طور مشابهی تکنیک‌های مستقل از کشت آشکار کرد که تنوع شکارگرها بسیار بیشتر از مقادیر به‌دست‌آمده توسط توصیف سویه‌ها است(۲۶). بدلوویبریوباکتریووروس اولین شکارگر کشف شده که مطالعات زیادی بر روی آن انجام گرفته

است(۱۸). عموماً مطالعات انجام یافته بر روی این ارگانیسم بر روی سایر شکارگرها هم تعمیم داده می شود. چرخه‌ی سلولی شکارگرها شامل مرحله سلول‌های مرحله‌ی حمله و سلول‌های مرحله رشد و تقسیم است. سلول‌های فاز حمله کوچک، متحرک، تک تاژه‌ای هستند و قادر به تکثیر در خارج از طعمه نیستند. درچرخه‌ی سلولی بدلوویبریو ابتدا شکارگر فاز حمله با حرکت فعال تاژه‌ای به سمت طعمه حرکت می‌کند و سپس با برخورد به سلول طعمه به آن به صورت اتصال برگشت‌پذیر یا دائمی می چسبد سپس حرکت تاژه‌ای متوقف می‌شود و شکارگر خود را وارد فضای پری‌پلاسمی طعمه می کند و در فضای پری‌پلاسمی، دیواره‌ی سلولی طعمه را توسط آنزیم‌ها تغییر می‌دهد و به غشای پلاسمایی طعمه متصل می‌شود که این اتصال به مدت طولانی در طول شکار حفظ می‌شود(۱۸)، سپس طعمه به دلیل تغییر یافتن دیواره‌ی سلولی گرد می‌شود و شکارگر به درون پری‌پلاسم رشد کرده و DNA خود را همانندسازی می‌کند. این مرحله دلوپلاست نامیده می‌شود. بعد از این مرحله، شکارگر درمی‌یابد که سیتوپلاسم طعمه تمام شده است و با سنتز دیواره میانی به چندین زاده تقسیم می‌شود و نهایتاً غشای باقیمانده‌ی طعمه شکافته شده و دلوویبریوها آزاد می‌شوند(۳۱). باکتریووراکس استولپی یکی از شکارگرهایی است که از آب های شیرین و مخصوصا رودخانه ها جداسازی شده است(۱۴). مطالعات کمی بر روی ساختار و فیزیولوژی این باکتری تا به حال انجام یافته است ولی بر طبق مطالعات گذشته ساختار و نحوه زندگی آن مانند سایر شکارگرهاست و مثل دلو ویبریو باکتریووروس می تواند به بسیاری از گرم منفی ها حمله کند(۱۳). در سال ۲۰۰۵ کادوری و همکاران ثابت کردند که باکتری‌های شکارگر قادرند به سویه‌های بالینی گوناگون باکتری‌های گرم منفی تولیدکننده‌ی بتالاکتاماز و MDR حمله کنند(۱۱). پژوهش حاضر با هدف استفاده از باکتری های شکارگر باکتریووراکس استولپی برای درمان عفونت های سوختگی در موش بزرگ آزمایشگاهی انجام یافت.

مواد و روش ها

تعداد ۳۰ سر رت بزرگ آزمایشگاهی از نژاد آلبینو ان ماری، از هر دو جنس نر و ماده به وزن ۳۰+ ۲۵۰ گرم استفاده شد. این موش‌ها از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه و سپس در شرایط مناسب از نظر نور و حرارت، نگهداری شدند. پس از چند روز که حیوانات به محیط سازش یافتند به صورت تصادفی به گروه های مشخص شده در جدول ۱ تقسیم بندی شدند(۱). بعد از اخذ کد اخلاق به شماره IR. IAU. ARDABIL. REC. 101 .1396 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اردبیل از داروی بیهوشی نبوپنتال سدیم با نام تجارتی نسدونال محصول شرکت اسپشیای فرانسه به میزان ۴۵mg/ kg بر حسب وزن حیوان به روش داخل صفاقی تزریق انجام گردید(۱۰). بر اساس طرح سوزاندن استاندارد حیوانات، قالبی ساخته شد که قسمتی از بدن حیوان را که باید در معرض آب داغ قرار گیرد محدود می‌کرد که سوختگی از نوع درجه دو ایجاد می کرد. برای محاسبه وسعت سوختگی از فرمول A=KW2/3 که در آن A سطح بدن بر حسب سانتی متر مربع، W وزن بدن بر حسب گرم و K ضریب ثابتی است که در مورد رت برابر ۱۰ می‌باشد استفاده شد. با استفاده از این فرمول می‌توان وسعت سوزاندن را در حیوانی که وزن آن مشخص است تعیین کرد. سطح مقطع در این آزمایش برابر ۱۷ سانتی متر مربع می‌باشد که وسعتی برابر ۱۰ درصد مجموع سطح بدن رت را شامل می‌شود. حیوان بیهوش را به روی میز منتقل و به شکم خوابانده و سپس موهای ناحیه پشت حیوان کاملاً تراشیده شده و حیوان به نحوی در قالب قرار می گرفت که بلندترین قسمت پشت او در مرکز سوراخ واقع در قالب جای گیرد. به این ترتیب در تمامی نمونه ها قسمت تقریباً مشابه‌ی از ناحیه پشت با

آب داغ تماس یافته و سوزانده می‌شد(۲۲، ۲). پس از ۶ ثانیه حیوان را از آب داغ دور کرده و پشت آن را با گاز استریل خشک کرده و هر حیوان را در یک قفس آزاد می‌شد به منظور جبران آب از دست رفته در اثر سوختگی، به حیوانات، با توجه به وزن آن‌ها مقداری محلول نرمال سالین به روش داخل صفاقی تزریق گردید(۲۲، ۲). برای آلوده کردن زخم‌های سوختگی، از جدایه های سودوموناس مقاوم به دارو که از زخم های سوختگی توسط شهباززاده و همکاران به دست آمده بود استفاده شد(۲۵). نیم میلی لیتر از محلول که حاوی 10^8CFU/ml باکتری بود توسط پیپت پاستور برداشته شد و بر روی زخم‌های سوختگی موش‌های صحرائی که ۲۴ ساعت از سوختگی آن ها می گذشت، انتقال یافت. باکتری باکتریووراکس استولپی از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد شیراز تهیه و بعد از ایجاد زخم سوختگی و عفونی کردن گروه ها توسط باکتری باکتریووراکس استولپی 10^8CFU/ml، سیپروفلوکساسین ۵µg/ml و جنتامایسین ۱۰ µg/ml محصول شرکت solarbio چین تیمار شدند نمونه برداری با استفاده از سواپ استریل آغشته به نرمال سالین انجام و شمارش کلونی ها به صورت یک روز در میان انجام گرفت. سپس بر روی محیط بلاد آگار پایه به روش خطی کشت داده شد و با گروه کنترل(سوخته و عفونی شده) مقایسه گردید. در روزهای ۵، ۱۰،۱۵ و ۲۰ از زخم‌های ایجاد شده عکس برداری همراه با خط کش مدرج انجام شد و برای انجام اندازه گیری زخم از نرم افزار . image J استفاده و مساحت کلی زخم اندازه گیری شد. نمونه برداری به منظور انجام بررسی های میکروسکوپی در روز ۲۱ انجام گردید. به این منظور ابتدا موش ها یوتانایز شدند. برای یوتانایز کردن موش ها از ماده بیهوشی اتر استفاده گردید. موش‌ها ابتدا درون ظرفی درب دار قرار گرفتند و سپس یک پنبه آغشته به اتر در داخل ظرفی که موش در آن قرار داشت گذاشته شد و درب ظرف بسته شد و با کمک این روش موش‌ها به شیوه های بدون درد کشته شدند. موهای روییده در ناحیه زخم قبل از انجام نمونه‌برداری زدوده و سپس با استفاده از یک اسکالپل برش تمام ضخامت در پوست ایجاد و نمونه موردنیاز جهت بررسی آسیب‌شناسی برداشته شد. در هنگام برداشت نمونه هم از بافت پوست سالم و هم از بافت زخم نمونه‌برداری گردید تا امکان مقایسه بافت سالم و زخم وجود داشته باشد. بعد از برداشت نمونه، بافت زیر جلد از لحاظ حضور چسبندگی بررسی شد. نمونه‌های تهیه شده در ظرف های نمونه‌گیری حاوی فرمالین ٪۱۰ قرار داده و بعد از ۴۸ ساعت فرمالین نمونه‌ها عوض و از تمام نمونه‌های بافتی جهت بررسی‌های هیستوپاتولوژی مقطع بافتی تهیه شد. ارزیابی هیستوپاتولوژیک به روش سیستم امتیازبندی Adam و همکاران انجام شد. بر اساس این روش برای بررسی تأثیر آسیب بر روی ساختارهای اپی تلیال حضور یا عدم حضور هایپرپلازی اپیدرم، هایپرکراتوز اپیدرم و ضمایم اپیدرم مانند فولیکول‌های مو ارزیابی شدند. اثرات آسیب بر روی ساختارهای مزانشیمی نیز با تعیین حضور یا عدم حضور عضلات صاف، عضلات عقب کشنده مو، تزاید عروقی، فیبروپلازی و ضخیم یا سازمان یافته، نبودن رشته های کلاژن ارزیابی شد. انجام مطالعات آسیب شناسی در دو زمینه، میزان اپی تلیزاسیون و شمارش سلول های التهابی(ماکروفاژ و نوتروفیل) انجام گرفت. نتایج با استفاده از آزمون های آماری ANOVA و tukey در نرم افزار SPSS22 انجام گرفت و نمودارها توسط اکسل ۲۰۱۳ رسم گردید.

نتایج

نتایج بررسی شمارش کلونی های باکتری سودوموناس مقاوم به چند دارو در طی ۲۱ روز در جدول ۲ آورده شده است نتایج حاکی از تاثیر باکتری شکارگر بر کاهش میزان سودوموناس مقاوم به چند دارو در زخم های عفونی موثر بود. در روز اول شمارش کلونی ها نتایج حاکی از عدم

تفاوت آماری در نمونه ها بود بعد از روز ۵ تفاوت آماری در سطح$P\leq$۰/۰۵ بین گروه های کنترل و گروه باکتریوورکس مشاهده شد و این تفاوت آماری تا روز ۲۱ ادامه داشت. هم چنین در روز ۹ تفاوت آماری در سطح ۵ درصد بین گروه تیمار شده باکتریووراکس با گروه‌های آنتی بیوتیک مشاهده شد و این تفاوت تا روز آخر ادامه داشت(۰/۰۵ $\geq$P). بین گروه های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین نیز تا آخرین روز تفاوت معنی داری دیده نشد. بررسی بیشتر نتایج حاکی از این مورد است که باکتری باکتریوورکس عملکردی بهتر از گروه های آنتی بیوتیکی داشته اند مقایسه مساحت سطح زخم در گروه های آلوده شده با سودوموناس های جدا شده در نمودار۱ آورده شده است نتایج نشان می دهد که گروه های که با باکتری‌های شکارگر درمان شده بودند نسبت به گروه کنترل مثبت به صورت معنی داری کاهش مساحت زخم را داشته اند(۰/۰۵ $\geq$P). بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان می‌دهد که استفاده از باکتری شکارگر امتیاز بیشتری نسبت به دو گروه آنتی بیوتیک و گروه کنترل کسب کرده بود(۰/۰۵ $\geq$P). به این صورت که از لحاظ تعداد و جهت رشته های کلاژن تفاوت معنی داری در بین امتیازات داده شده به موش ها در گروه تیمار شده با شکارگر با گروه‌های آنتی بیوتیک و کنترل مشاهده شد(۰/۰۵ $\geq$P). از لحاظ حضور سلول های فیبروبلاست نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار شده با باکتری شکارگر با سایر گروه ها وجود داشت(۰/۰۵ $\geq$P). در موش های گروه تیمار با باکتری شکارگر تفاوت معنی داری از نظر میزان عروق و جهت عروق در لایه درم نسبت به گروه کنترل و گروه های تیمار دیگر مشاهده شد(۰/۰۵ $\geq$P). از لحاظ شدت التهاب نیز تفاوت معنی داری بین گروه های تیمار شده با آنتی بیوتیک ها و باکتری شکارگر عملکرد بهتری نسبت به گروه کنترل داشتند(۰/۰۵ $\geq$P). از لحاظ پرخونی تفاوت معنی داری بین گروه های مطالعه دیده نشد(۰/۰۵ $\geq$P)(جدول ۳). مقاطع بافت شناسی در گروه های مختلف از لحاظ ضمایم پوست شامل مو، غدد سباسه و غدد عرق هیچگونه تفاوت معنی داری نشان ندادند(۰/۰۵ $\geq$P)(شکل ۲). نتایج نمودار ۱ نشان می دهد که رت هایی که با سودوموناس آلوده شده و با باکتری های شکارگر تیمار شدند در انتهای آزمایش به مراتب نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش مساحت زخم بیشتری را داشته اند(شکل ۱) و درمان با باکتری های شکارگر توانست در کاهش مساحت زخم به صورت معنی داری مثبت عمل کند(۰/۰۵ $\geq$P). درمان با آنتی بیوتیک نیز نسبت به گروه کنترل مثبت به صورت معنی داری باعث کاهش زخم شده بود ولی تفاوت معنی داری بین گروه باکتری های شکارگر و آنتی بیوتیک ها وجود نداشت(۰/۰۵ $\geq$P).

بحث ونتیجه گیری

کارهای تحقیقاتی بر روی اثر ترمیمی شکارگرها بر روی زخم های سوختگی تا حالا صورت نگرفته است و پژوهش حاضر اولین پژوهش در این حوزه بوده است. در مطالعه حاضر زخم های سوختگی بعد از ایجاد با سودوموناس آئروجینوزا عفونی شدند و تحت تیمار با باکتری شکارگر و آنتی بیوتیک قرار گرفتند نتایج شمارش کلونی های زخم های سوختگی در پژوهش حاضر نشان داد که باکتری باکتریووراکس استولپی توانسته است از روز سوم به صورت معنی داری میزان باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را در زخم ها نسبت به گروه کنترل و گروه های تیمار شده با آنتی بیوتیک کاهش دهد. نتایج یافته های سوتون و همکاران(۲۰۱۹) نیز نشان داد که باکتری های شکارگر توانایی کاهش کلونی-های استافیلوکوکوس را در زخم ها دارند(۲۸). چو و همکاران(۲۰۱۹) در پژوهش دیگری تاثیر شکارگرها را بر روی عفونت های مقاوم به دارو در زخم های عفونی بررسی کردند که نشان داده شد که شکارگرها با کاهش میزان گرم منفی ها در زخم ها روند بهبودی را در زخم-

های عفونی مقاوم به درمان تسریع می کنند(۸). به نظر می-رسد که باکتریووراکس استولپی با مکانیسم شکارگری خود که شامل شناسایی سودوموناس آئروجینوزا و نفوذ به فضای پری پلاسمی این باکتری و نابود کردن آن مانع از هجوم باکتری ها به سلول های اپی تلیالی و میزان کلونی-های این باکتری را در زخم کاهش داده اند. نتایج حاصل از مقایسه مساحت سطح زخم در گروه های آلوده شده با سودوموناس های جدا شده نشان داد که گروه های که با باکتری‌های شکارگر درمان شده بودند نسبت به گروه کنترل مثبت به صورت معنی داری کاهش مساحت زخم را داشته اند به نظر می رسد که اثر مثبت شکارگرها در کاهش مساحت زخم سوختگی مربوط به کاهش میزان سودوموناس در زخم ها و هم چنین تحریک سنتز فیبروبلاست ها و تحریک ماکروفاژهای بافتی بوده است(۲۴).

جدول ۱-تعداد گروه های مورد بررسی در پژوهش حاضر

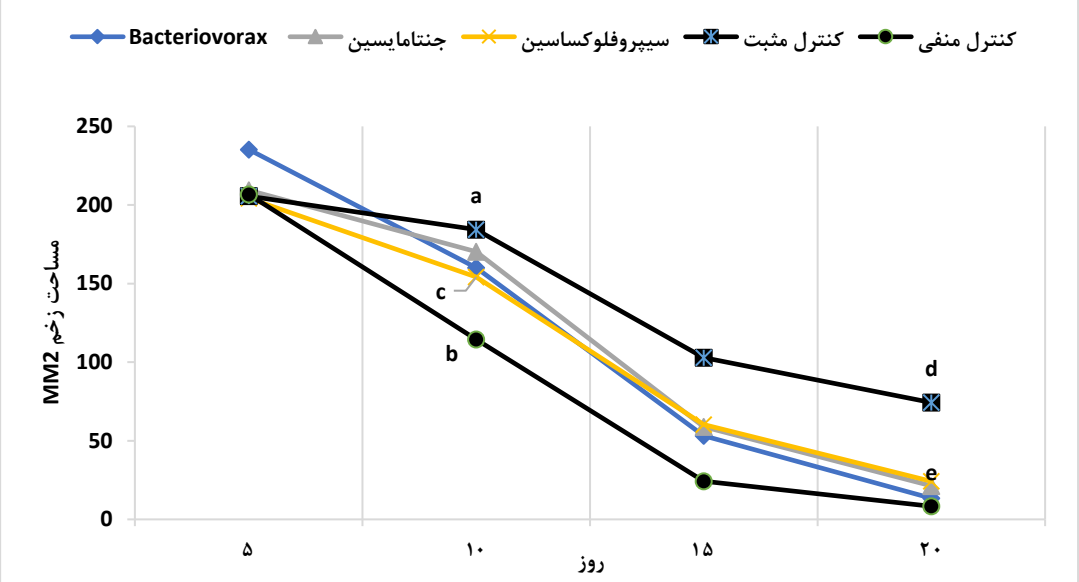
کنترل		تیمار		
		تیمار باکتریووراکس استولپی 10^8 CFU/ml	تیمار آنتی بیوتیکی	
کنترل-	کنترل +		جنتامایسین µ ۱۰g/ml	سیپروفلوکساسین µ ۵g/ml
سوخته و فاقد عفونت و درمان	سوخته و عفونی شده با سودوموناس 10^8 CFU و بدون درمان برای هر جدایه	سوخته و عفونی شده با سودوموناس و درمان با باکتریووراکس استولپی	سوخته و عفونی شده با سودوموناس و درمان با جنتامایسین	سوخته و عفونی شده با سودوموناس و درمان با سیپروفلوکساین

جدول ۲- شمارش کلونی های زخم های سوختگی در گروه های رت آلوده به سودومانس (حروف های ناهمسان در هر ردیف و ستون نشان از تفاوت معناداری در سطح P<۰.۰۵ است).

	تعداد کلونی در روزهای										
تیمار	یک	سه	پنج	شش	نه	یازده	سیزده	هفده	نوزده	بیست و یک
جنتامایسین	۳۴۵^{a}	۴۱۰^{ab}	۴۴۰^{b}	۴۹۰^{b}	۵۳۰^{c}	۵۶۱^{c}	۵۷۹^{gc}	۵۹۸^{g}	۶۴۰^{g}	۶۹۱^{g}
سیپروفلوکساسین	۳۷۱^{a}	۳۹۰^{a}	۴۰۱^{ab}	۴۴۱^{b}	۴۹۰^{cb}	۵۰۳^{c}	۵۴۱^{c}	۵۸۵^{cg}	۶۰۹^{g}	۶۲۰^{g}
باکتریوورکس	۳۸۱^{a}	۳۹۸^{a}	۳۴۰^{a}	۳۰۱^{a}	۲۶۷^{d}	۲۴۵^{d}	۲۰۸^{e}	۱۳۲^{e}	۹۷^{F}	۴۳^{F}
کنترل	۳۸۰^{a}	۴۰۱^{ab}	۴۷۸^{b}	۵۴۱^{c}	۶۰۵^{c}	۶۷۱^{g}	۷۳۱^{h}	۷۹۰^{h}	۸۰۱^{h}	۸۱۰^{h}

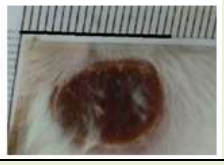
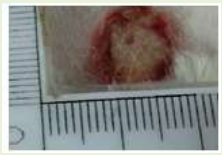
جدول ۳-نتایج امتیاز هیستوپاتولوژیک

شاخص آماری	تیمار با سیپروفلوکساسین	تیمار با جنتامایسین	تیمار با باکتریووراکس	کنترل
میانگین	۵/۱	۵/۲	۶/۵	۴/۴
انحراف معیار	۰/۹۹	۱/۲۱	۱/۷۸	۰/۵۸
خطای معیار	۰/۳۲	۰/۳۸	۰/۴۵	۰/۲۳

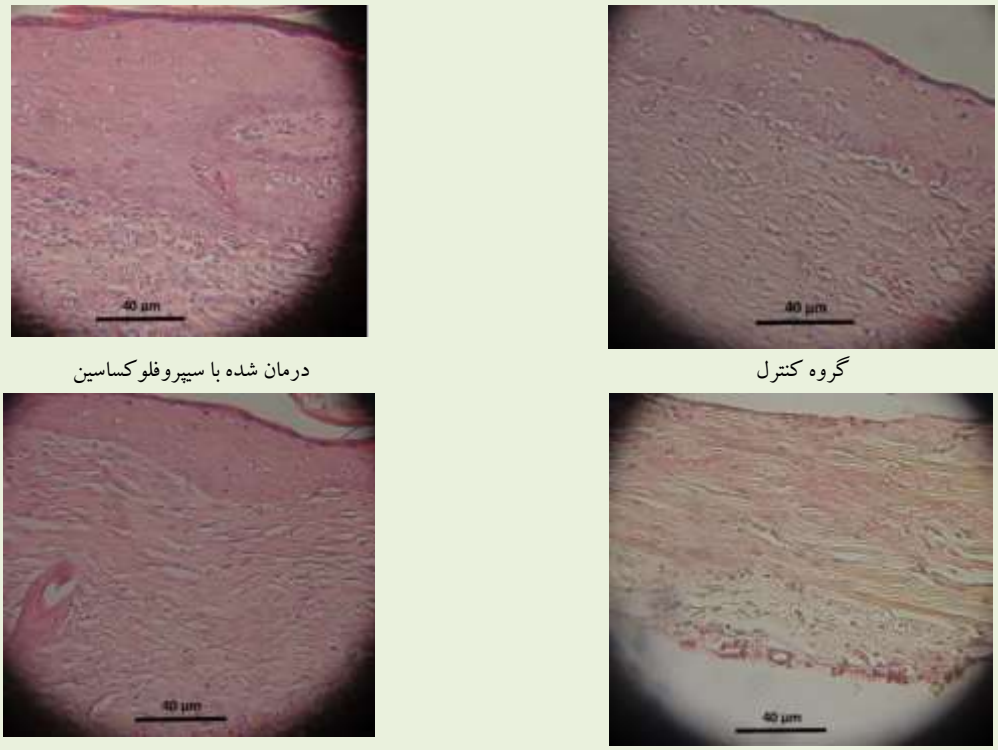


نمودار ۱- مقایسه میانگین مساحت زخم برحسب mm ۲در گروه های مورد آزمایش در روزهای پس از آلودگی با *سودوموناس*

حروف های ناهمسان در هر ردیف و ستون نشان از تفاوت معناداری در سطح $P<0.05$ است.

روز	تیمار با سیپروفلوکساسین	تیمار با باکتریووراکس	تیمار با جنتامایسین	کنترل
ه				
ب				
ج				
ب				

شکل ۱- زخم های سوختگی و فرآیند بهبود آن ها در رت های سوخته



شکل ۲- مقاطع بافت شناسی از تیمارهای مختلف رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین ائوزین

مطالعات گذشته که از بررسی عفونت های ایجاد شده توسط باکتری های مقاوم به دارو بر روی قرنیه چشم انجام گرفته بود نشان داد که استفاده از باکتری شکارگر میزان سودوموناس های مقاوم به آنتی بیوتیک را خیلی بهتر از آنتی بیوتیک های رایج درمان می کند(۶).یافته های بافت‌شناسی این مطالعه بیان گر تأثیرمثبت باکتریووراکس استولپی در گرانولاسیون و اپیتلیوم سازی سریع تر و افزایش کلاژن سوختگی پوستی در موش های مورد مطالعه بود به نظر می رسد که باکتری شکارگر مورد مطالعه با کاهش فرآیند التهاب باعث تسریع اپیتلیوم سازی شده است پژوهش های بونفیگیلو و همکاران نشان داد که شکارگرها با تسریع مرحله التهاب فرآیند التیام زخم را شدت می بخشد(۴). کاهش التهاب احتمالاً از طریق القای فاکتورهای پس از التهاب از قبیل سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد در فرآیند ترمیم موثر هستند نتایج گذشته حاکی از این مورد است که برخی از شکارگرها ترشح IL-۸ را توسط سلول های اپی تلیالی کاهش می دهند(۲۰). اینترلوکین ۸ ،نوعی واسطه ایمنی می‌باشد که از ماکروفاژها و انواع دیگری از سلول ها مانند سلول های اپی تلیالی تولید می شود و تولید سیتوکین های محافظ را که احیای سلول های اپی تلیالی را تسهیل و مرگ سلولی سلول های اپی تلیالی را مهار می نمایند، القا می کند(۳). سیتوکین ها قادر به فعال سازی ماکروفاژها هستند و لنفوسیت های B را مبدل به پلاسماسل می کنند و تولید کلاس‌های مختلف آنتی بادی را القا می کنند(۱۵). گرانولاسیون و اپیتلیوم سازی و افزایش کلاژن سوختگی پوستی در موش های مورد مطالعه هم چنین ممکن است با تاثیر باکتری شکارگر مورد بررسی بر تحریک سیستم ایمنی، هجوم و فعال کردن ماکروفاژها انجام گرفته باشد. باکتری های شکارگر می توانند با افزایش سلول های نوتروفیلی درمحل ضایعه روند بهبود زخم را سرعت ببخشند(۳۲). پژوهش حاضر هم چنین نشان داد که تعداد فیبروبلاست ها در گروه تیمار شده با شکارگر در مقایسه با گروه های دیگر میزان فیبروبلاست بیشتری داشته اند به

نظر می رسد که باکتری شکارگر با افزایش میزان فیبرونکتین حین تشکیل بافت دانه دار بستر مناسبی برای مهاجرت و رشد این سلول ها را فراهم می کند تا انقباض زخم به طور موثر صورت گیرد. علاوه بر این فیبرونکتین تکیه گاهی مناسب برای رشته زایی نیز محسوب می‌شود(۱۷). با توجه به نتایج فوق نتیجه گرفته می شود که باکتری باکتریوواکس استولپی با شکار سودوموناس آئروجینوزا در سطح زخم های عفونی شده باعث کاهش میزان کلونی های سودوموناس آئروجینوزا در زخم ها شده است. فرآیند بهبود زخم و کاهش مساحت آن به نظر می رسد که شکارگرها با تعدیل در مرحله التهاب، افزایش فیبروبلاست ها و افزایش میزان عروق باعث کاهش مساحت زخم شده اند.

تشکر و قدردانی

از تمام کسانی که همکاری لازم را در این تحقیق داشته اند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1.Afkhamzadeh, A., Majidi, F., Ahmadi, C. (2016). Risk factors for nosocomial infections among burn patients hospitalized in Tohid hospital, Sanandaj, Kurdistan Iran. medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences, 59(4); 225–32.

2.Alebachew, T., Yismaw, G., Derabe, A., Sisay, Z. (2012). *Staphylococcus aureus* burn wound infection among patients attending Yekatit 12 hospital burn unit, Addis Ababa, Ethiopia. Ethiopian Journal of Health Sciences, 22(3).

3.Bester, J., Pretorius, E. (2016). Effects of IL-1β, IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. Scientific Reports, 6(1);1–10.

4.Bonfiglio, G., Neroni, B., Radocchia, G., Pompilio, A., Mura, F., Trancassini, M. (2020). Growth Control of Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC) by the predator bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus*: a new therapeutic approach for crohn's disease patients. Microorganisms, 8(1);17.

5.Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. Trends in Microbiology. 2011;19(8):419–26.

6.Bumbarger, D., Riebesell, M., Sommer, R. (2013). System-wide rewiring underlies behavioral differences in predatory and bacterial-feeding nematodes. Cell., 152(1–2);109–19.

7.Cheng W, Shen C, Zhao D, Zhang H, Tu J, Yuan Z, et al. The epidemiology and prognosis of patients with massive burns: A multicenter study of 2483 cases. Burns. 2019;45(3):705–16.

8.Cho, G., Kwon, J., Soh, SM., Jang, H., Mitchell, RJ. (2019). Sensitivity of predatory bacteria to different surfactants and their application to check bacterial predation. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(19); 8169–78.

9.Clayton, NA., Nicholls, CM., Blazquez, K., Brownlow, C., Maitz, PK., Fisher, OM. (2018). Dysphagia in older persons following severe burns: Burn location is irrelevant to risk of dysphagia and its complications in patients over 75 years. Burns, 44(8);1997–2005.

10. Dakhili, M., Hodaei, M. (2019). Identification and pattern of antibiotic bacterial sensitivity and resistance in patients in the nekoi hospital of gom city in 1395. 9(35); 1–10.

11. Kadouri, D., O'Toole, GA. (2005). Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. Applied and Environmental Microbiology, 71(7); 4044–51.

12. Keshavarz, M., Javanmardi, F., Mohammdi, AA. (2020). A decade epidemiological study of pediatric burns in south west of Iran. World Journal of Plastic Surgery, 9(1); 67.

13. Killham, K., Prosser, JI. (2015). Chapter 3 - The bacteria and archaea. in: paul ea, editor. soil microbiology, ecology and biochemistry (fourth edition) [internet]. fourth edition. boston: Academic Press, p. 41–76. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124159556000037.

14. Lami, FH., Naser, RK. Al. (2019). Epidemiological characteristics of burn injuries in Iraq: A burn hospital-based study. Burns, 45(2); 479–83.

15. Lee, J., Ryu, HW., Lee, SU., Kim, M., Kwon, O., Kim, MO. (2019). *Pistacia weinmannifolia* ameliorates cigarette smoke and lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting interleukin-8 production and NF-κB activation. International Journal of Molecular Medicine, 44(3); 949–59.

16. Lim, SZP., Fitzgerald, DA. (2018). Treating resistant *Pseudomonas aeruginosa* lung disease in young children with cystic fibrosis. Paediatric Respiratory Reviews, 27;33–6.25. Wolf SE,

Cancio LC, Pruitt BA. Epidemiological, demographic and outcome characteristics of burns. In: Total burn care. Elsevier; 2018. p. 14–27.

17. Monnappa, AK., Dwidar, M., Seo, JK., Hur, J-H., Mitchell, RJ. (2014). *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. Scientific Reports, 4;3811.

18. Monnappa, AK., Dwidar, M., Mitchell, RJ. (2013). Application of bacterial predation to mitigate recombinant bacterial populations and their DNA. Soil Biology and Biochemistry. 57; 427–35.

19. Najmi, Y., Kumar, P. (2019). A retrospective analysis of electric burn patients admitted in King Fahad Central Hospital, Jizan, Saudi Arabia. Burns Open, 3(2); 56–61.

20. Negus, D., Moore, C., Baker, M., Raghunathan, D., Tyson, J., Sockett, RE. (2017). *Predator versus* pathogen: how does predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* interface with the challenges of killing Gram-negative pathogens in a host setting? Annual Review of Microbiology, 71; 441–57.

21. Peck, MD. (2011). Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. Burns, 37(7); 1087–100.

22. Rezaei, E., Safari, H., Naderinasab, M., Aliakbarian, H. (2011). Common pathogens in burn wound and changes in their drug sensitivity. Burns, 37(5); 805–7.

23. Ribeiro, LM., Vieira, LG., Sousa, JM., Guerra, AS. (2019). Seasonal impact in burn profiles in a dedicated burn unit. Burns,

24. Romanowski, EG., Stella, NA., Brothers, KM., Yates, KA., Funderburgh, ML., Funderburgh, JL. (2016). Predatory bacteria are nontoxic to the rabbit ocular surface. Scientific Reports, 6(1); 1–9.

25. Shahbazzadeh, M., Moazamian, E., Rafati, A., Fardin, M. (2020). Antimicrobial resistance pattern, genetic distribution of ESBL genes, biofilm-forming potential, and virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the burn patients in Tehran Hospitals, Iran. The Pan African Medical Journal [Internet], Jul 30 [cited 2020 Oct 13];36(233). Available from: https://www.panafrican-med journal. com/ content/ article/36/233/full/

26. Starr, MP., Huang, JC-C. (1972). Physiology of the *Bdello vibrios*. In: Rose AH, Tempest DW, editors. Academic Press; 8; 215–61. Available from: http:// www. sciencedirect. com/science/article/pii/S0065291108601915

27. Starr, MP., Stolp, H. (1976). Chapter VI *Bdello vibrio* methodology. In: Norris JR, editor. Academic Press, 9;217–44. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951709700431

28. Sutton, D., Livingstone, PG., Furness, E., Swain, M., Whitworth, DE. (2019). Genome-wide identification of myxobacterial predation genes and demonstration of formaldehyde secretion as a potentially predation-resistant trait of *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Microbiology, 10;2650.

29. Swann, JA., Matthews, MR., Bay, C., Foster, KN. (2019). Burn injury outcome differences in Native Americans. Burns, 45(2); 494–501.

30. Wang, W. (2011). Bacterial diseases of crabs: A review. Journal of Invertebrate Pathology. 106(1); 18–26.

31. Waso, M., Khan, S., Ahmed, W., Khan, W. (2020). Expression of attack and growth phase genes of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the presence of Gram-negative and Gram-positive prey. Microbiological Research, 235; 126437.

32. Wilgus, TA., Roy, S., McDaniel, JC. (2013). Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. Advances in Wound Care, 2(7); 379–88.

33. Wolf, S.E., Cancio, L.C., Pruitt, B.A. (2018). Epidemiological, demographic and outcome characteristics of burns, in: Total Burn Care. Elsevier, 14–27.

Evaluation of *Bacteriovorus stalpii* Predator on the Healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected Burn Wounds in Rats

M. Shahbazzadeh[1], **E. Moazamian[1]**, A.Reza Rafati[2], M. Fardin[3]

1. . Department of Microbiology, Faculty of Science, Agriculture and Modern technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

2.Division of Pharmacology & Pharmaceutical Chemistry, Sarvestan Branch, Islamic Azad University. Shiraz, Iran. **moazamian@iaushiraz.ac.ir**

3.Department of Microbiology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Received:2021.13.8 **Accepted: 2021.7.10**

Abstract

Inroduction & Objective: Drug-resistant infection is one of the leading causes of death from burn injuries. *Bacteriovorus stalpii*, like other predators, invades and destroys the periplasmic space of gram-negative bacteria. The aim of the present study was to investigate the *Bacteriovorus stalpii* on the healing rate of *Pseudomonas aeruginosa*-infected burn wounds in rats.

Material and Methods: 30 albino rats were randomly divided into 5 groups of positive, negative, gentamicin, ciprofloxacin and staphylococcal bacteriorex after 3 burn wounds.30 rats N-MRI were randomly divided in to 5 groups positive and negative control, gentamicin, ciprofloxacin and *Bacteriovorus stalpii*, and except for the negative control group, all groups Burned and Infected by 4 multidrug resistant *Pseudomonas* isolates. After treatment with bacteria and antibiotics, wound colonies were reported every other day and wound area was measured within 20 days.

Results: The results of colony count showed that *Bacteriovorus stalpii* in infected wounds significantly reduced the amount of bacteria in 21 days compared to other groups and this decrease was better than the performance of gentamicin and ciprofloxacin antibiotics. Measurement of wound area over 20 days also showed that the use of predatory bacteria reduced wound area in burnt rat compared to control groups. Histological examination of the resulting wounds showed that the predatory bacteria reduced inflammation, increased fibroblasts cell and increased tissue collagen compared to the control group.

Conclusion: *Bacteriovorus stalpii* can accelerate the treatment process in drug-resistant infections.

Keywords: Predators of Bacteria, *Bacteriovorus stalpii*, Burn Wound, Drug-Resistant.