Original Article

Identification of bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, and bla_{TEM} Genes in Pseudomonas Aeruginosa Strains Isolated from Human and Animal Samples Using Multiplex-PCR Method

Farzaneh Farzali Shirehjini[1], Kioumars Amini[1*], Hossein Fatahi[2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Kioumars Amini,
Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Email:
dr_kumarss_amini@yahoo.com

Received: 8 Jun, 2015

Accepted: 22 Feb, 2016

Abstract

Background and Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causes of opportunistic infections. The infection caused by *P. aeruginosa* is commonly severe and life-threatening and hard to treat due to limited susceptibility to antibiotics and development of resistance during treatment. The aim of the present study was to identify bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, and bla_{TEM} genes in *P. aeruginosa* strains isolated from human and animal samples using Multiplex-PCR method.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, a total of 120 isolates of *P. aeruginosa* were obtained from of human samples and animal raw milk. Antibiotic susceptibility test was determined by gel diffusion method and according to CLSI guidelines. Cellular DNA was extracted by CinnaPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram-negative Bacteria and CSF) and Multiplex-PCR was performed for identification of bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, and bla_{TEM} genes.

Results: In this study, the highest resistance in human and animal samples, was seen to amoxicillin and amikacin (100%) and the lowest resistance was to ciprofloxacin with frequency of 90% in human samples and 93.4% in animal samples. Based on the CDT results, 37(60.8%) isolates showed ESBLs phenotype, and based on the M-PCR results, 26 (21.6%) and 41 (34.2%) strains had bla_{CTX-M} and bla_{TEM} genes, respectively.

Conclusion: The results of this study indicated that *P. aeruginosa* strains have high levels of resistance. Also, the frequency of these genes is high among human and animal isolates, therefore controlling these bacteria in humans and animals is of particular importance.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa;* Beta-lactamase; Antibiotic susceptibility; Drug hypersensitivity.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره یازدهم، بهمن ۹۵
صفحه ۵۱ الی ۶۰

مقاله پژوهشی
(Original Article)

شناسایی ژن‌های CTX-M، bla_{SHV} و TEM در سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جداشده از نمونه‌های انسانی و دامی به روش Multiplex-PCR

فرزانه فرضعلی شیره جینی[۱]، کیومرث امینی[۱*]، حسین فتاحی[۲]

[۱]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

[۲]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
کیومرث امینی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
dr_kumarss_amini@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۴

چکیده

زمینه و هدف: *پسودوموناس آئروژینوزا*، یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت‌های فرصت‌طلب می‌باشد. عفونت ایجادشده به‌وسیله *پسودوموناس آئروژینوزا*، اغلب شدید و تهدیدکننده بوده و درمان آن به دلیل حساسیت محدود به عوامل آنتی‌بیوتیکی و کسب مقاومت در حین درمان، مشکل است. مطالعه حاضر با هدف شناسایی ژن‌های *CTX-M*، bla_{SHV} و *TEM* در سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های انسانی و دامی به روش Multiplex-PCR انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی – مقطعی، در مجموع تعداد ۱۲۰ جدایه *پسودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های انسانی و شیرخام حیوانات به دست آمد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی طبق دستورالعمل CLSI و براساس روش انتشار در ژل تعیین گردید. DNA سلولی با استفاده از کیت DNA–سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF)، استخراج و PCR چندگانه به‌منظور شناسایی ژن‌های *CTX-M*، *SHV* و *TEM* انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، بیشترین میزان مقاومت در بین نمونه‌های انسانی و دامی برای آموکسی‌سیلین، آمیکاسین (۱۰۰٪) و کمترین میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین با فراوانی ۹۰٪ در بین نمونه‌های انسانی و ۹۳/۴٪ در بین نمونه‌های دامی مشاهده گردید. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی طبق دستورالعمل CLSI و براساس روش انتشار در ژل تعیین شد. طبق نتایج CDT، ۷۳ (۶۰/۸٪) ایزوله، فنوتیپ ESBLs را از خود نشان دادند و براساس نتایج M-PCR؛ ۲۶ (۲۱/۶٪) و ۴۱ (۳۴/۲٪) سویه، حاوی ژن *CTX-M* و *TEM* بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا*، مقاومت بالایی دارند. همچنین فراوانی این ژن‌ها در بین ایزوله‌های دامی و انسانی بالا می‌باشد، در نتیجه کنترل این باکتری‌ها هم در انسان و هم دام، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

کلید واژه‌ها: *پسودوموناس آئروژینوزا*؛ بتالاکتاماز؛ حساسیت آنتی‌بیوتیکی؛ حساسیت دارویی.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

**Farzali Shirehjini F, Amini K, Fatahi H. Identification of bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, and bla_{TEM} genes in pseudomonas aeruginosa strains isolated from human and animal samples using Multiplex-PCR method.
Qom Univ Med Sci J 2017;10(11):51-60. [Full Text in Persian]**

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017

مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا، باسیلی گرم منفی، اکسیداز مثبت، فاقد اسپور، دارای تاژک و هوازی اجباری است (۱). از میان اعضای خانواده پسودوموناسه، این باکتری مهم‌ترین پاتوژن فرصت‌طلب، به‌ویژه در بیماران دارای نقص در عملکرد سیستم ایمنی مانند سوختگی، استفاده‌کنندگان از کاتترهای داخل وریدی یا ادراری، بیماران نوتروپنیک، مبتلایان به ایدز، سرطان، لوسمی و افراد مبتلا به سیستیک فیبروزیس می‌باشد (۲). این پاتوژن فرصت‌طلب، طیف وسیعی از بیماری‌ها از قبیل: عفونت زخم و سوختگی، مننژیت، عفونت دستگاه ادراری (UTI)، عفونت گوش داخلی و خارجی، کراتیت، عفونت تنفسی، استئومیلیت، گاستروانتریت، سپسیس، تب، اندوکاردیت و پنومونی را دربرمی‌گیرد (۳). مقاومت ذاتی به مواد ضدمیکروبی در *پسودوموناس آئروژینوزا* سبب وخیم‌ترشدن وضعیت درمان عفونت‌های آن می‌شود. اغلب سویه‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک (MDR)، توانایی تولید طیف وسیعی از آنزیم‌های بتالاکتامازی را دارند که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام، عامل مقاومت در برابر لاکتام‌ها می‌باشد (۴). Ambler براساس همولوژی پروتئین یا تشابه آمینواسیدی این پروتئین‌ها، بتالاکتامازها را به چهار گروه مختلف (A/B/C/D) تقسیم‌بندی کرد (۵). آنزیم‌های نوع A، C و D؛ سرین بتالاکتاماز هستند، اما نوع B یک متالوبتالاکتاماز (MBLs) با کوفاکتور روی است. بتالاکتامازهای نوع A و C، شایع‌ترین بوده که C همان سفالوسپورینیاز می‌باشد (۶). ESBLs از بتالاکتامازهای نوع A و گروه 2be بوده و توسط پلاسمید کد می‌شود که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل دوم، سوم و آزترونام مقاوم است (۷). این آنزیم‌ها به‌وسیله مهارکننده‌های بتالاکتاماز شامل: کلاولانیک‌اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند. تاکنون بیش از ۱۵۰ نوع ESBLs شناسایی شده که ۵ نوع از آنها شامل: *SHV*، *TEM*، *VEB*، *PER*، *GES/IBC* و *OXA* type (کلاس D) در *پسودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شده است. *TEM* و *SHV*، سردسته آنزیم‌های فوق هستند و دیگر آنزیم‌ها با تغییر در توالی یک یا چند اسید آمینه در دو آنزیم مذکور حاصل می‌شوند (۸). در نمونه‌های بالینی تایپ *SHV*، فراوان‌ترین نوع، ESBLs می‌باشد. بتالاکتامازهای *SHV*، اولین‌بار در جنس کلبسیلا شرح داده شد و به‌عنوان بتالاکتامازهای مقاوم به پنی‌سیلین با طیف اثر کم (Narrow-spectrum) معرفی گردید. ژن کدکننده *SHV* پلاسمیدی بوده و بنابراین، به‌راحتی در میان سویه‌های باکتریایی منتشر می‌شود (۹). بتالاکتامازهای *SHV* متعلق به کلاس A، طبقه‌بندی Ambler و کلاس ۲be و ۲b، طبقه‌بندی Bocsh بوده که به‌وسیله کلاولانیک اسید؛ مهار، اما با EDTA مهار نمی‌شود. *TEM*، اولین ESBL شناسایی‌شده است که به‌طور وسیع در خانواده انتروباکتریاسه گسترش یافته و به‌عنوان رایج‌ترین بتالاکتاماز شناخته می‌شود و حتی به *هموفیلوس آنفولانزا* و *نیسریا گنوره آ نیز* انتقال یافته است (۱۰). انواع مختلفی از بتالاکتاماز نوع *TEM* با جابه‌جایی در توالی اسیدهای آمینه از *TEM-1* به‌وجود آمده‌اند. *TEM-1*، اولین بتالاکتامازی است که به‌وسیله پلاسمید در انتروباکتریاسه‌ها کد شده و سایر باکتری‌ها از قبیل *پسودوموناس آئروژینوزا* نیز قادر به تولید آن هستند (۱۱). گروهی از آنزیم‌های ESBLs وجود دارند که به خانواده *TEM* و یا *SHV* متعلق نبوده و بر روی سفوتاکسیم مؤثرند و تحت عنوان CTX-M شناسایی می‌شوند. *CTX-M*، معمولاً به‌وسیله پلاسمید کد می‌شود. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌های طیف گسترده را داشته و توسط کلاولانیک اسید و تازوباکتام مهار می‌شوند. تاکنون بیش از ۵۰ نوع *CTX-M* شناسایی شده که همگی متعلق به ۵ گروه اصلی ($CTX\text{-}M_{1/2/8/9/25}$) هستند (۱۲). این ارگانیسم به‌علت افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌ویژه ظهور سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR)، مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از آن، هم در عرصه پزشکی و هم دامپزشکی ایجاد کرده است. همچنین گسترش ژن‌های مقاوم به دیگر سویه‌ها؛ حتی باکتری‌ها و ایجاد سویه‌های مقاوم نیز از دیگر معضلات موجود در درمان است. مطالعه حاضر با هدف شناسایی همزمان ژن‌های *CTX-M*، bla_{SHV} و *TEM* در سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های انسانی و دامی، به روش M-PCR و تعیین الگوی حساسیتی این سویه‌ها انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی که در طی یک بازه زمانی

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017

۶ ماهه از ابتدای اسفند سال ۱۳۹۳ تا پایان مرداد سال ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۱۲۰ نمونه غیرتکراری، به‌صورت کاملاً تصادفی شامل: ۶۰ نمونه از ترشحات تنفسی بیماران بستری با علائم بالینی (پنومونی) به دلیل استفاده از دستگاه‌های تنفس مصنوعی (۹،۷) در بیمارستان‌های مختلف شهر تهران، همچنین تعداد ۶۰ نمونه از شیرخام گاوهای مبتلا به ورم پستان با علائم کاهش شیر و مقاومت به درمان، از دام‌ها (۱۳) جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه نمونه‌های به‌دست‌آمده بر روی محیط بلادآگار، مک‌کانکی و ستریمیدآگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت از نظر تشکیل کلنی و رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور تأیید کلنی‌های رشدیافته مشکوک به *پسودوموناس آئروژینوزا*، از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، سیترات، TSI، اندول، متیل‌رد و ووگس پروسکوئر (MR-VP)، اوره‌آز، تست OF (اکسیداسیون-تخمیر)، رشد در ۴۲ درجه سانتیگراد و تولید پیگمان در محیط ستریمید آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. سویه‌های تعیین هویت‌شده تا زمان انجام آزمایشها در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) (مرک، آلمان)، حاول ۲۰٪ گلیسرول و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در تمامی مراحل این مطالعه، از سویه رفرانس *پسودوموناس آئروژینوزا* ،ATCC 27853 به‌عنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد. در ادامه، جدایه‌های تعیین هویت‌شده در محیط عصاره قلب - مغز آگار (BHI، مرک، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول، کشت داده شده و در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از دیسک بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) برای آنتی‌بیوتیک‌های (Mast، ساخت انگلیس) تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۲۵ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم)، تازوباکتام- پیپراسیلین (۱۰/۱۰۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفازولین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، و جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، براساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (۱۴) انجام شد. سپس ایزوله‌های که در روش کربی بائر به چندین سفالوسپورین مقاوم بودند از نظر وجود آنزیم‌های ESBLs مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور از روش دیسک ترکیبی (Combined Disk Test-CDT)، براساس معیارهای استاندارد آزمایشگاه و بالینی (CLSI, 2013) استفاده گردید. پس از تهیه کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند، سوسپانسیونی میکروبی به‌صورت چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید (۱۰/۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید (۱۰/۳۰ میکروگرم) تهیه‌شده از شرکت Mast انگلستان، به فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متر از هم بر روی محیط قرار گرفتند و یک‌شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند.

(با توجه به ضوابط CLSI، اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاولانیک اسید، بزرگتر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به دیسک سفتازیدیم به تنهایی بوده و یا اینکه هاله عدم رشد اطراف دیسک سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید، بزرگتر یا مساوی ۳ میلی‌متر نسبت به سفوتاکسیم به‌تنهایی باشد، آن سویه به‌عنوان مولد ESBLs در نظر گرفته می‌شود.) به‌منظور تکثیر ژن‌های کدکننده ESBLs، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از کیت CinnaPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria, and CSF) (سیناکلون، ایران) استخراج گردید. برای تکثیر ژن‌های *CTX-M*، bla_{SHV} و *TEM*، از توالی‌های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ استفاده شد (جدول شماره ۱) (۱۵).

جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج‌شده نیز از دستگاه فتوبیومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. در نهایت، واکنش M-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05U/µl)، $MgCl_2$ (3mM) و dNTPs (0.4mM)، ۰/۸ میکرولیتر از هریک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۰/۷ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017

۱۴ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۵ سیکل به‌صورت زیر انجام گرفت:

مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک‌دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۵ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر) در مقایسه با سویه استاندار *پسودوموناس آئروژینوزا*، COL-1 الکتروفورز گردید.

جدول شماره ۱: جدول توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده‌شده

نام قطعه هدف	توالی پرایمر ('3- '5)	طول قطعه هدف (bp)
blaTEM	F-TGCCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	۴۴۵
blaCTX-M	F-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	۵۹۳
blaSHV	F- ATGCGTTATATTCGCCTGTG R- TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	۷۴۷

یافته‌ها

براساس مطالعات استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی، از ۱۲۰ نمونه به‌دست‌آمده انسان و دام، تعداد ۶۰ سویه از نمونه‌های انسانی و ۶۰ سویه از شیرخام تهیه‌شده از دام، به‌عنوان حجم نمونه در نظر گرفته شد. طبق نتایج، تمامی جمعیت تحت مطالعه (۱۰۰٪) مشکوک به عفونت با *پسودوموناس آئروژینوزا*، از نظر وجود این ارگانیسم، مثبت بودند. نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مختلف نشان داد بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آموکسی‌سیلین در تمامی نمونه‌های انسانی و دامی، ۱۰۰٪ و میزان مقاومت به سفوتاکسیم در نمونه‌های انسانی، ۹۱/۶٪ و در نمونه‌های دامی، ۹۰٪ بوده است. همچنین ۹۰٪ نمونه‌های انسانی و ۹۳/۴٪ نمونه‌های دامی به سیپروفلوکساسین و ۷۳/۳٪ سویه‌های انسانی و ۸۳/۳٪ سویه‌های دامی به سفتازیدیم حساسیت داشتند. از لحاظ آماری ($p<۰/۰۵$)، تفاوتی بین نتیجه آنتی‌بیوگرام در نمونه‌های انسانی و دامی مشاهده نشد. در شناسایی سویه‌های تولیدکننده ESBLs با استفاده از روش CDT مشخص گردید در مجموع، ۷۳ ایزوله (۶۰/۸٪) از نمونه‌های انسانی و دامی، تولیدکننده ESBLs بوده‌اند. همچنین براساس نتایج تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه مولد ESBLs، بالاترین میزان مقاومت به‌ترتیب مربوط به آموکسی‌سیلین و آمیکاسین (۱۰۰٪) در بین تمامی نمونه‌های انسانی و دامی و پایین‌ترین میزان مقاومت مربوط به سیپروفلوکساسین با فراوانی (۹۰٪) در بین نمونه‌های انسانی و (۹۳/۴٪) در بین سویه‌های دامی بود (جدول شماره ۲ و ۳). نتایج حاصل از آزمون M-PCR، به‌منظور تکثیر ژن‌های کدکننده ژن‌های *CTX-M*، bla_{SHV} و *TEM* بر روی تمامی ۱۲۰ ایزوله‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* شناسایی‌شده با استفاده از آزمون‌های تست‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نشان داد فراوانی ژن‌های *bla CTX-M* و *TEM* به ترتیب برابر ۲۱/۶٪ (۲۶ سویه) و ۳۴/۲٪ (۴۱ سویه) می‌باشد. ژن بتالاکتاماز *SHV*، در هیچ نمونه‌ای شناسایی نشد. همچنین هیچ‌یک از ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های دامی ردیابی نگردید. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول M-PCR در شکل ارائه شده است.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017

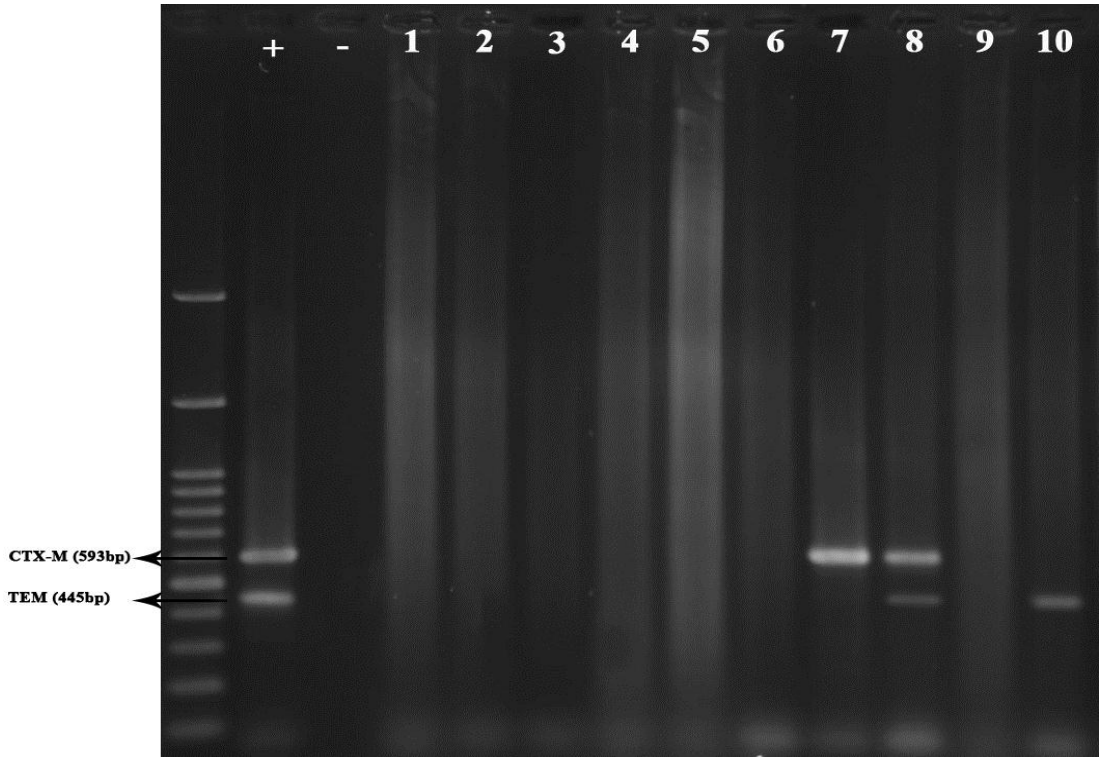
جدول شماره ۲: میزان حساسیت سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* نمونه‌های انسانی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، برحسب تعداد و درصد

گروه‌ها / نوع آنتی‌بیوتیک	سویه‌های مقاوم (R)	سویه‌های نیمه‌حساس (I)	سویه‌های حساس (S)
سفوتاکسیم	۵۵ (٪۹۱/۶)	۴(٪۶/۷)	۱ (٪۱/۷)
سفتازیدیم	۱۰ (٪۱۶/۷)	۶ (۱۰)	۴۴ (٪۷۳/۳)
آموکسی‌سیلین	۶۰ (٪۱۰۰)	۰(٪۰)	۰(٪۰)
سیپروفلوکساسین	۲ (٪۳/۳)	۴(٪۶/۷)	۵۴ (٪۹۰)
آمیکاسین	۶۰ (٪۱۰۰)	۰(٪۰)	۰(٪۰)
جنتامایسین	۴۹ (٪۸۱/۷)	۴(٪۶/۷)	۷ (٪۱۱/۶)
تری متوپریم – سولفامتوکسازول	۱۰(٪۱۶/۷)	۲۶(٪۴۳/۳)	۲۴(٪۴۰)
توبرامایسین	۳۱(٪۵۱/۷)	۱۷(٪۲۸/۳)	۱۲(٪۲۰)
سفکسیم	۴۰(٪۶۶/۷)	۴(٪۶/۷)	۱۶(٪۲۶/۶)
سفپودوکسیم	۳۰(٪۵۰)	۱۰(٪۱۶/۷)	۲۰(٪۳۳/۳)
تازوباکتام - پیپراسیلین	۲۷(٪۴۵)	۱۳(٪۲۱/۷)	۲۰(٪۳۳/۳)
سفازولین	۵۰(٪۶۰)	۱۴(٪۲۳/۳)	۱۰(٪۱۶/۷)
سفتریاکسون	۲۱(٪۳۵)	۸(٪۱۳/۳)	۳۱(٪۵۱/۷)
ایمی‌پنم	۴۲(٪۷۰)	۲(٪۳/۳)	۱۶(٪۲۶/۷)

جدول شماره ۳: میزان حساسیت سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* نمونه‌های دامی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، برحسب تعداد و درصد

گروه‌ها / نوع آنتی‌بیوتیک	سویه‌های مقاوم (R)	سویه‌های نیمه‌حساس (I)	سویه‌های حساس (S)
سفوتاکسیم	۵۴ (٪۹۰)	۲(٪۳/۳)	۴ (٪۶/۷)
سفتازیدیم	۷ (٪۱۱/۷)	۳ (٪۵)	۵۰ (٪۸۳/۳)
آموکسی‌سیلین	۶۰ (٪۱۰۰)	۰(٪۰)	۰(٪۰)
سیپروفلوکساسین	۴ (٪۶/۶)	–	۵۶ (٪۹۳/۴)
آمیکاسین	۶۰ (٪۱۰۰)	۰(٪۰)	۰(٪۰)
جنتامایسین	۷ (٪۱۱/۷)	–	۵۳ (٪۸۸/۳)
تری متوپریم – سولفامتوکسازول	۳(٪۵)	۱۵(٪۲۵)	۴۲(٪۷۰)
توبرامایسین	۴۷(٪۷۸/۴)	۳(٪۵)	۱۰(٪۱۶/۶)
سفکسیم	۵۴(٪۹۰)	۱(٪۱/۷)	۵(٪۸/۳)
سفپودوکسیم	۴۵(٪۷۵)	۲(٪۳/۳)	۱۳(٪۲۱/۶)
تازوباکتام - پیپراسیلین	۴۲(٪۷۰)	۴(٪۶/۶)	۱۴(٪۲۳/۳)
سفازولین	۴۸(٪۸۰)	–	۱۲(٪۲۰)
سفتریاکسون	۳۴(٪۵۶/۷)	۸(٪۱۳/۳)	۱۸(٪۳۰)
ایمی‌پنم	–	۳(٪۵)	۵۷(٪۹۵)

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017



شکل: نتایج واکنش MPCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی، C^+ کنترل مثبت، C^- کنترل منفی.
چاهک‌های ۵-۱ نمونه‌های *پسودوموناس آئروژینوزای* به‌دست‌آمده از نمونه‌های دامی؛ چاهک‌های ۱۰-۶ نمونه‌های *پسودوموناس آئروژینوزای* به‌دست‌آمده از نمونه‌های انسانی، DNA مارکر 100bp (سیناژن، ایران).

بحث

سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزای* مقاوم، یک تهدید جدی برای سلامت عمومی محسوب می‌شود که نگرانی‌های فراوانی را در جامعه پزشکی، به‌ویژه در بخش درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR)، در افراد با نقص سیستم ایمنی ایجاد کرده است (۱۶). نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام برای ۱۴ آنتی‌بیوتیک مختلف نشان داد ایمی‌پنم و سیپروفلوکساسین به‌ترتیب با حساسیتی برابر ۹۵٪ و ۹۳/۴٪ در میان نمونه‌های دامی و سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون به ترتیب با فراوانی ۹۰٪ و ۵۱/۷٪، مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها در بین نمونه‌های انسانی هستند. همچنین نتایج تست مقاومتی نشان داد تمامی ۱۲۰ نمونه جداشده از دام و بالینی انسان (۱۰٪) دارای مقاومت به آموکسی‌سیلین و آمیکاسین بوده و در نتیجه این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان سویه‌های مقاوم به *پسودوموناس آئروژینوزا*، ناکارآمد می‌باشند. سلیمی و همکاران (۱۷) (سال ۲۰۰۸)، میزان مقاومت به سفتازیدیم را برابر ۷۵/۲٪ اعلام کرد که با مطالعه حاضر مغایرت داشت و میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک، ۱۶/۷٪ گزارش شد.

در مطالعه ایراجیان و همکاران (۱۸) نیز میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین،۹۸/۷٪؛ به توبرامایسین، ۹۵٪ و به سفتازیدیم، ۱۰۰٪ بود. علت عدم مغایرت مطالعه این محققین با مطالعه حاضر می‌تواند در نوع نمونه، محل انجام آزمون، بازه زمانی و دیسک‌های مورد استفاده باشد. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر ایمی‌پنم (۶۳/۳٪) با مطالعه میرصالحیان (۱۹) و عزیز ژاپنی (۲۰) همخوانی داشت، ولی با دیگر مطالعات مانند خسروی و همکاران (۲۱)، صادری و همکاران (۲۲) و سلیمی و همکاران (۱۷) همخوانی نداشت. علت این عدم همخوانی می‌تواند در نتیجه تفاوت در نمونه‌ها و حجم نمونه‌گیری باشد. در مطالعه حاضر، آنالیز آماری Pearson Chi-Square نشان داد هیچ تفاوت معنی‌داری در نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام در نمونه‌های بالینی و دامی وجود ندارد. همچنین نتایج تست فنوتیپی ترکیبی، به‌منظور شناسایی سویه‌های مولد ESBLs نشان داد ۷۳ ایزوله (۶۰/۸٪)، تولیدکننده ESBLs بوده‌اند، درحالی‌که نتایج حاصل از آزمون M-PCR نشان داد فراوانی ژن‌های *CTX-M* و *TEM* به ترتیب برابر ۲۶ سویه (۲۱/۶٪)، و ۴۱ سویه (۳۴/۲٪) می‌باشد.

ولی هیچ‌یک از نمونه‌ها واجد ژن bla_{SHV} نبودند. علت اختلاف بین نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی می‌تواند در نتیجه استفاده از دیگر آنزیم‌های بتالاکتامازی مانند *OXA-type*، *GIS*، *VIM*، *NDM* و.. باشد. همچنین هیچ‌یک از ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های دامی ردیابی نشد.

در مطالعه حیدری (سال ۱۳۹۴)، فراوانی ژن *CTX-M*، برابر با ۱۳ ایزوله (۲۱/۶٪) گزارش گردید (۲۳). شکیبایی و همکاران (سال ۲۰۰۸) نیز حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف *SHV* و *TEM* را در میان سویه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند که از میان ۱۲۰ سویه *پسودوموناس آئروژینوزا*، ۴۱ سویه (۳۴٪)، به‌عنوان تولیدکننده ESBL شناسایی شدند و بعد از انجام PCR، فراوانی ژن‌های مذکور به ترتیب برابر ۴/۱ و ۲/۵٪ بود (۲۴). شاهچراغی (سال ۲۰۰۹) در بررسی مولکولی بتالاکتامازهای *TEM* و *SHV* در ۶۰۰ سویه باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های زخم در دو بیمارستان تهران، نشان داد توزیع ژن‌های بتالاکتاماز *SHV* و *TEM* به ترتیب ۲۲ و ۹٪ می‌باشد (۲۵). Bradford و همکاران (۲۶) نیز نشان دادند بیشترین فراوانی آنزیم‌های ESBL در ایالات متحده مربوط به خانواده *TEM* بتالاکتاماز بوده است. در یک مطالعه در ترکیه (۲۷) بر روی نمونه‌های باکتری‌های روده‌ای به‌دست‌آمده از بیمارستان، شیوع ژن *TEM-1*، ۵۲/۷٪ برآورد گردید، درحالی‌که در ایتالیا این میزان، ۵۶/۴٪ گزارش شد (۲۸).

علت اختلافات موجود در پژوهش حاضر با سایر مطالعات می‌تواند در نتیجه اختلاف جغرافیایی، بهداشت منطقه و اقدامات کنترلی باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تشخیص آزمایشگاهی *پسودوموناس آئروژینوزای* مولد ESBLs، حایز اهمیت است؛ زیرا توانایی انتشار به سویه‌های حساس و در نتیجه ایجاد سویه‌های مقاوم، به‌ویژه سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) وجود دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا*، مقاومت بالایی دارند. همچنین فراوانی این ژن‌ها در بین ایزوله‌های دامی و انسانی، بالا می‌باشد. بنابراین، آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی باید قادر باشند سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* تولیدکننده بتالاکتاماز و ژن‌های دخیل در مقاومت را تشخیص دهند، و از مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک در دامپروری جهت جلوگیری از ظهور سویه‌های مقاوم در جوامع انسانی جداً خودداری شود. همچنین پایش مداوم الگوی مقاومت به ژن‌های مختلف می‌تواند در ارائه راهکار درمانی مناسب و جلوگیری از ایجاد مقاومت به داروهای نسل جدید مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از مدیریت و کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی پاسارگاد تقدیر و تشکر نمایند.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017

References:

1. Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, pel, and psl. Front Microbiol 2011;2:167.

2. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Med Mal Infect 2006;36(2):78-91.

3. Navon-Venezia S, Bem-Ami R, Carmeli Y. Update on Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumani Infections in the Healthcare Setting. Curr Opin Infect Dis 2005;18(4):306-13.

4. Del MM, de AP. Mecanismo de resistenciae detection das betalactamases de espectro ampliado. Ciênc Biol Saúde Londrina 2005;7(1):59-63.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017

5. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of Pseudomonas aeruginosa producing metallo beta lactamases in a large centralized labratory. J Clin Microbiol 2005;43(7):3129-35.

6. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, et al. Multifocal outbreaks of metallo beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa resistant to broad spectrum beta lactams including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 1996;40(2):349-53.

7. Hemalatha V, Uma S, Vijaylakshmi K. Detection of metallo betalactamase producing Pseudomonas aeruginosa in hospitalized patients. Indian J Med Res 2005;122(2):148-52.

8. Bonnet R. Growing group of extended spectrum β -lactamases: The CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(1):1-14.

9. Rodrigues AC, Chang MR, Nobrega GD, Rodrigues MS, Carvalho NC, Gomes BG, et al. Metallo-beta-lactamase and genetic diversity of Pseudomonas aeruginosa in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. Braz J Infect Dis 2011;15(3):195-9.

10. Martino DP, Gagniere H, Berry H, Bret J. Anti- biotic resistance and virulence properties of Pseudomo-nas aeruginosa strains from mechanically ventilated Pa- tients with Pneumonia in Intensive Care Units: Compari- son with imipenem resistant extra-respiratory tract isolates from uninfected patients. Microbes Infect 2002;4(6);613-20.

11. Chen H, Yuan M, Livermore D. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst Pseudomonas aeruginosa isolates collected in the UK in 1993. J Med Microbiol 1995;43(4):300-9.

12. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: An emerging group of extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 2000;14(2):137-42.

13. Shem M, Malole J, Machangu R, Kurwijila L, Fujihara T. Incidence and causes of sub-clinical mastitis in dairy cows on smallholder and large scale farms in tropical areas of Tanzania. Asian Australas J Anim Sci 2001;14(3):372-7.

14. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement: Setting the standard for quality in clinical laboratory testing around the world. Clin Lab Stand Inst (M100-S25) 2015;35(3):2-16.

15. Zaranza AV, Morais FC, Carmo MS, Marques AM, Andrade-Monteiro C, Ferro TF, et al. Antimicrobial susceptibility, biofilm production and adhesion to HEp-2 cells of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples. J Biomater Nanobiotechnol 2013;4(3);98-106.

16. Wirth FW, Picoli SU, Cantarelli VV, Gonçalves ALS, Brust FR, Santos LMO, et al. Metallo-ß-Lactamase and Pseudomonas aeruginosa in two hospitals from Southern Brazil. Braz J Infect Dis 2009;13:170-2.

17. Salami H, Owlia P, Yakhchali B, Rastegar Lari A. Drug susceptibility and molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa isolated in a burn unit. Am J Infect Dis 2009;5(4):308-13.

18. Fazeli H, Moslehi TZ, Irajian GR, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in Pseudomonas aeruginosa strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). Iranian J Med Microbiol 2009;3(4):1-8. [Full Text in Persian]

19. Mirsalehian A, Feyzabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jebel Ameli F, Goli H. Prevalence of extended spectrum beta lactamase in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. J Tehran Univ Med Sci 2008;66(5):333-7. [Full Text in Persian]

20. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad SH. Susceptibility patterns and cross resistance of antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in the south of Iran. Burns 2006;32(3):343-7.

21. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallobeta- lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. Diagn Microbiol Infect Dis 2008;60(1):125-8.

22. Saderi H, Karimi Z, Owlia P, Bahar MA, Akhavi Rad SMB. Phenotypic Detection of Metallo- beta- lactamase producing Pseudomonas aeruginosa strain Isolated from Burned patients. Iran J Pathol 2008;3(1):20-24. [Full Text in Persian]

23. Haidari E, Akya A. The frequency of broad-spectrum beta-lactamase CTXM genotypes in Pseudomonas aeruginosa isolated from Kermanshah hospitals (2013-14). J Kermanshah Univ Med Sci 2015;19(4):207-14. [Full Text in Persian]

24. Shacheraghi F, Shakibaie MR, Noveiri H. Molecular Identification of ESBL Genes bla GES-1, blaVEB-1, blaCTX-M blaOXA-1, blaOXA-4,blaOXA-10 and blaPER-1 in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Burn Patients by PCR, RFLP and Sequencing Techniques. Int J Biol Life Sci 2010;6(3):138-42.

25. Shacheraghi F, Nikbin V, Shorj F, Shafii M. Molecular Identification of bla IMP-1, bla VIM-1, bla SPM in Pseudomonas aeruginosa isolated from hospitalized patients in Imam Khomeini hospital. J Shahid Beheshti Medi Sci 2009:2:67-72. [Full Text in Persian]

26. Bradford PA. Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14(4):933–51.

27. Gur D, Gulay Z, Akan OA, Aktaş Z, Kayacan CB, Cakici O, et al. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: Results of the multicenter HITIT study. Mikrobiyol Bul 2008;42(4):537-44.

28. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. J Clin Microbiol 2004;42(6):2523-9.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:52 IRST on Saturday November 25th 2017