Original Article

An Investigation of the Prevalence of AmpC-producing Pseudomonas aeruginosa in Clinical Samples in Zahedan City, Iran

Javad Adabi[1], Shahram Shahraki Zahedani[1,2], Mohammad Bokaeian[1,2], Hamed Tahmasebi[1]*

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.*

[2]*Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Hamed Tahmasebi, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

Email: h.tahmasebi87@yahoo.com

Received: 11 Apr, 2016

Accepted: 29 Mar, 2016

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017

Abstract

Background and Objectives: AmpC beta-lactamases are among cephalosporinases encoded on the chromosomes of many *Enterobacteriaceae*. In many bacteria, induction of AmpC enzymes can be made at a very high level by numerous mutations. In this study, the prevalence of chromosomal *AmpC* genes, was investigated in the isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from teaching hospitals in Zahedan city in 2015.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, 100 *P. aeruginosa* isolates were isolated from 391 clinical samples using biochemical and conventional methods. cefoxitin (30µg) disk diffusion method was used to isolate AmpC-producing strains, and multiplex PCR was used to identify chromosomal *AmpC* genes. *ESBL* containing strains was assessed using ceftazidime (30µg) and cefotaxime/clavulanic acid (30µg/10µg) disk diffusion tests. Data analysis was performed using χ^2 test.

Results: In primary phenotypic screening, out of 100 *P. aeruginosa* isolated, 88 isolates were *ESBL* producers and 20 isolates (20%) were AmpC beta-lactamase producers. Among 20 phenotypically identified AmpC producing isolates, 19 isolates (95%) had *FOX* gene, 7 isolates (35%) had *EBC* gene, 4 isolates (20%) had *ACC* gene, and 15 isolates isolates (75%) had *DHA* gene, which were detected by multiPlex PCR assay.

Conclusion: The results of the present study indicated that the presence of AmpC leads to resistance of bacteria to many cephalosporins. Also, use of multiplex PCR yields the best results in the group identification of these genes.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa;* AmpC beta-lactamases; Beta-lactam resistance; Drug resistance.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره چهارم، تیر ۹۶
صفحه ۶۱ الی ۷۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی شیوع سودوموناس آئروژینوزای مولد *AmpC* در نمونه‌های بالینی شهر زاهدان

جواد ادبی[1]، شهرام شهرکی زاهدانی[1،2]، محمد بکائیان[1،2]، حامد طهماسبی[1*]

[1]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

[2]مرکز بیماری‌های عفونی گرمسیری زاهدان، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
حامد طهماسبی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
h.tahmasebi87@yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۵/۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۹

چکیده

زمینه و هدف: *AmpC* بتالاکتامازی، ازجمله سفالوسپورین‌هایی است که بر روی کروموزوم‌های بسیاری از انتروباکتریاسه‌ها کد می‌شود. در بسیاری از باکتری‌ها، القای آنزیم‌های *AmpC*، می‌تواند در سطح بسیار بالا توسط جهش‌های فراوان صورت گیرد. در این مطالعه، شیوع ژن‌های کروموزومی *AmpC* از ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیمارستان‌های آموزشی شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - مقطعی از ۳۹۱ نمونه بالینی، ۱۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* به‌وسیله آزمایشهای بیوشیمیایی و معمول، جداسازی شدند. برای جداسازی سویه‌های تولیدکننده *AmpC*، از روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین (۳۰میکروگرم) و برای شناسایی ژن‌های کروموزومی *AmpC* از روش MultiPlex PCR استفاده شد. برای سنجش سویه‌های دارای آنزیم *ESBL*، تست دیسک دیفیوژن سفتازیدیم (۳۰میکروگرم) و سفتازیدیم/کلاولانیک اسید (۳۰میکروگرم/۱۰میکروگرم) به کار برده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری K2 آنالیز شدند

یافته‌ها: از ۱۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* در غربالگری فنوتیپی اولیه، ۸۸ سویه، مولد آنزیم ESBL و ۲۰ ایزوله، مولد آنزیم *AmpC* بودند. از ۲۰ ایزوله شناسایی‌شده مولد *AmpC* به روش فنوتیپی، ۱۹ ایزوله (۹۵٪) دارای ژن FOX، ۷ ایزوله (۳۵٪) دارای ژن *EBC*، ۴ ایزوله (۱۰٪) دارای ژن *ACC* و ۱۵ ایزوله (۷۵٪) دارای ژن *DHA* بودند، که با روش MultiPlex PCR مشخص شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد حضور *AmpC* باعث مقاومت باکتری به تعداد زیادی از سفالوسپورین‌ها می‌شود. همچنین استفاده از روش مولکولی MultiPlex PCR، بهترین نتیجه را در شناسایی گروهی این ژن‌ها دارد.

کلید واژه‌ها: *سودوموناس آئروزینوزا*؛ بتالاکتاماز *AmpC*؛ مقاومت بتالاکتامازی؛ مقاومت دارویی.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Adabi J, Shahraki Zahedani Sh, Bokaeian M, Tahmasebi H. An investigation of the prevalence of AmpC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples in Zahedan City, Iran. Qom Univ Med Sci J 2017;11(4):61-71.[Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا، ازجمله باسیل‌های گرم منفی غیرتخمیری است که به فراوانی در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی یافت می‌شود (۳-۱). بیشتر سویه‌های جای‌گرفته در این باکتری، به آنتی‌بیوتیک‌های متنوعی مقاومت پیدا کرده‌اند که این مسئله باعث شده تا در گروه MDRها (Multidrug-resistant) قرار گیرند (۵،۴). MDRها، گروهی از باکتری‌ها هستند که به چند آنتی‌بیوتیک مختلف، مقاومت نشان می‌دهند و همین امر باعث ایجاد مقاومت‌های اکتسابی در آنان شده است (۶). در باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، ژن‌های مختلفی در بروز این مقاومت‌ها نقش دارند که هم روی کروموزوم و هم روی پلازمید حمل می‌شوند (۷). این ژن‌ها در باسیل‌های گرم منفی با تأثیر بر قسمت‌های مختلف، باعث بروز مقاومت‌ها متنوعی می‌شوند. یکی از این موارد، بیان آنزیم‌های بتالاکتاماز بوده که به‌طور مستقیم بر روی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی اثر می‌گذارد (۸). ژن‌های با منشأ پلازمیدی معمولاً بر روی پلازمیدهایی قرار دارند که می‌توانند به‌راحتی بین گونه‌ها، سویه‌ها و حتی جنس‌های مختلف انتقال یابند و این امر بررسی وابستگی ژن‌ها را با اهمیت بیشتری روبرو می‌کند (۹). بتالاکتامازها،آنزیم‌های باکتریایی هستند که قادرند آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز کرده و باعث بی‌اثرشدن این ترکیبات شوند (۱۱،۱۰). تصور بر این است که استفاده بیش از اندازه این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماران باعث تولید انواع بتالاکتامازها توسط باکتری‌ها می‌شود (۱۵-۱۲). بتالاکتامازهای کلاس A و C، رایج‌ترین آنها بوده و همانند بتالاکتامازهای کلاس D در جایگاه فعال خود دارای اسیدآمینه سرین می‌باشند. بتالاکتاماز کلاس B شامل متالوبتالاکتامازها بوده که کوآنزیم آنها فلز روی است (۱۶،۱۱). در طبقه‌بندی Jacoby, Bosch و Mendez تلاش شده تا ساختمان مولکولی بتالاکتامازها با عملکرد آنزیمی آنها در ارتباط باشد که بر این اساس، برمبنای نوع سوبسترایی که هیدرولیز می‌کنند به ۱۲ گروه عملکردی مرتبط با ۴ کلاس مولکولی تقسیم می‌شوند (۱۸،۱۷). بتالاکتامازهای نوع *AmpC* در گروه C قرار گرفته و شامل: CMY, LAT, BIL, ACT, MOX, FOX, DHA, ACC می‌باشند (۸،۷).

بتالاکتامازهای نوع *AmpC* در اواخر دهه ۱۹۷۰، ظاهر و مورد مطالعه قرار گرفتند. این آنزیم‌ها؛ *سفالوسپورین*‌های وسیع‌الطیف مانند سفتازیدیم، سفترياکسون، سفپیم و مونوباکتام‌هایی مانند آزترونام و سفامایسین‌ها را هیدرولیز می‌کنند، اما توسط مهارکننده‌های معمولی مانند کلاوولانات مهار نمی‌شوند (۲۰،۱۹). در اواخر دهه ۱۹۸۰، این ژن‌های کروموزومی قابل‌القا، بر روی پلاسمیدها ظاهر شده و به باکتری‌هایی که فاقد این ژن‌ها بودند منتقل شدند. مطالعه بر روی بتالاکتامازهای نوع *AmpC* از اواخر دهه ۱۹۷۰ شروع شد (۲۱). آنزیم‌ها *AmpC* که اغلب قابل‌القا توسط بتالاکتام‌ها هستند به‌وسیله ژن‌های کروموزومی کد شده و در بسیاری از باسیل‌های گرم منفی نیز وجود دارند. آنزیم *AmpC* نسبت به مهار با اسیدکلاولانیک مقاوم بوده و از نظر بیولوژیکی می‌تواند نسبت به سفامایسین و اکسی‌آمینوبتالاکتام نیز مقاومت پیدا کند (۲۲). بیشتر آنزیم‌های *AmpC*، سفالوسپورینازها هستند، ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها نظیر پنی‌سیلین‌ها را نیز دارا می‌باشند (۲۳). در اواخر دهه ۱۹۸۰، ژن‌های کروموزومی قابل‌القا روی پلاسمید آشکار شدند و به سایر باکتری‌های فاقد آنها نظیر *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا*، *اشرشیاکلی* و یا گونه‌های *سالمونلا* انتقال یافتند (۱۹). با توجه به اهمیت ظهور آنزیم‌های بتالاکتامازی نوع *AmpC*، همچنین گردش ژن‌های عامل این آنزیم در *سودوموناس آئروژینوزا* که باعث شکل‌گیری سویه‌های جدید در این باکتری شده است، مطالعه در این زمینه، بیشتر حس می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی وجود انواع ژن‌های *AmpC* کروموزومی در جدایه‌های به‌دست‌آمده از بیمارستان‌های شهر زاهدان بود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، طی یک دوره ۹ ماهه، ۳۹۱ نمونه (شامل نمونه‌های ادرار، خون، ترشحات زخم، خلط، لوله تراشه، لوله سینه، سر سوند)، از بیماران بستری در بخش‌های مختلف و بیماران سرپایی بیمارستان علی‌ابن‌ابیطالب (ع) زاهدان در سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017

سپس نمونه‌های جمع‌آوری‌شده داخل میکروتیوب‌های پلاستیکی درب‌دار {حاوی محیط ترانسپورت BHI (Merck آلمان) با ۱۰٪ گلیسرول}، تلقیح و برای انجام آزمایشهای تکمیلی و تشخیصی دقیق‌تر به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل گردید. نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایشها، نگهداری شدند.

تمامی نمونه‌ها (جهت تعیین هویت قطعی)، بر روی محیط کشت Cetremide Agar (شرکت Merck آلمان) کشت داده شده و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس ایزوله‌های به‌دست‌آمده از نظر تولید اکسیداز، تست OF و رشد در محیط‌های کشت TSI و سیمون سیترات آگار (همگی Merck آلمان) بررسی شدند. تست‌های کاتالاز، تولید SH_2 و گاز، تولید رنگدانه، ایندول، متیل‌رد و داشتن حرکت در محیط SIM (Merckآلمان) بر روی ایزوله‌ها انجام شد. پس از تعیین هویت نهایی جنس و گونه باکتری، ایزوله‌ها به‌صورت کشت ذخیره در محیط کشت Tripticase Soy Broth (Merck آلمان) با ۱۰٪ گلیسرول در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد جهت انجام مراحل بعدی نگهداری شدند.

برای تعیین سویه‌های ESBL، ابتدا از ایزوله‌های تعیین هویت‌شده، رقت ۰/۵مک‌فارلند تهیه گردید، سپس بر روی سطح پلیت حاوی محیط Mueller-Hinton agar (Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر به‌صورت سفره‌ایی کشت داده شدند. در ادامه، دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰میکروگرم) به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)/کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) و دیسک سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم) به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم)/کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) بر روی محیط قرار گرفتند (همگی MAST انگلستان). مطابق استاندارد CLSI، قطر هاله‌ها بررسی شد که قطر هاله عدم رشد در اطراف هریک از دیسک‌های کلاوکلانیک اسید به اندازه بیشتر یا مساوی با ۵ میلی‌متر در مقابل دیسک‌های فاقد کلاولانیک اسید، نشان‌دهنده حضور ESBL در ایزوله‌های به‌دست‌آمده بود (۱۴).

جهت تعیین سودوموناس‌های آئروژینوزا تولیدکننده بتالاکتاماز *AmpC* به روش فنوتیپی، آزمون غربالگری با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی وجود *AmpC*، از دیسک‌های سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و سفپودوکسیم (۱۰میکروگرم) (همگی Mast انگلستان) به همراه ترکیبات مهارکننده آنزیم *AmpC* استفاده شد. در این روش براساس مطالعه Tan و همکاران، غربالگری اولیه برای حضور *AmpC* مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی موارد از *کلبسیلا پنومونیه* ATCC700603، به‌عنوان نمونه کنترل مثبت و از *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853، به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۲۲).

میکروتیوب‌های حاوی BHI (Merck آلمان) ایزوله‌های بالینی ذخیره‌شده در ۲۰- درجه سانتیگراد، روی محیط بلاد آگار ساب کشت خطی داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس چند کلنی از هر ایزوله کشت داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth (sigmaaldrich آمریکا) که قبلاً درون لوله‌های درب‌دار شیشه‌ای به تعداد ایزوله‌ها، تقسیم و شماره‌گذاری شده بود، تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از سپری‌شدن زمان مورد نظر(۲۰ساعت)، لوله‌ها از انکوباتور خارج شدند. ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب‌های درب‌دار ۱/۵ پلاستیکی ریخته شد و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج سیناژن ایران انجام گرفت.

پرایمرهای تهیه‌شده از شرکت ماکروژن (به سفارش شرکت پیشگام ایران) بعد از اضافه کردن حجم مورد نظرآب مقطر، به رقت اولیه ۱۰۰ پیکومولار رسانده شدند، سپس رقت ۱۵ پیکومولار، از پرایمرهای Forward و Reverse تهیه گردید. بعد از یخچال‌گذاری، پرایمرها به مدت ۴ساعت در یخچال ۴+ درجه سانتیگراد و رقت‌های استوک برای انجام آزمایشهای بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. از DNAهای استخراج‌شده برای انجام PCR استفاده گردید. در این روند، از پرایمرهای زیر جهت تکثیر ژن‌های *AmpC* در نمونه‌های موردنظر استفاده شد.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017

جدول شماره ۱: لیست پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های کروموزومی سویه‌های سودوموناس آئروژینوازی مولد *AmpC*

ژن	نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدها	اندازه آمپلیکون‌ها (bp)	طول نوکلئوتیدها
MOX	MOXMF	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520	358–378
	MOXMR	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C		877–856
CIT	CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462	478–498
	CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC		939–919
DHA	DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405	1244-1265
	DHAMR	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC		1648–1628
EBC	EBCMF	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302	1115-1135
	EBCMR	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT		1416-1396
FOX	FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190	1475-1496
	FOXMR	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG		1664-1644
ACC	ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346	861–881
	ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC		1206–1186

هدف از انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، افزایش و تکثیر شدت‌یافته ژن‌های مورد نظر؛ یعنی ژن‌های *EBC, ACC, FOX, MOX, CIT, DHA,* می‌باشد. برای انجام واکنش PCR برای هر نمونه بدین ترتیب عمل شد:

۲۵ لاندا از مستر میکس قرمز (شرکت Ampliqonآلمان)

(شامل: Tris-Hcl PH8.5, (NH4)SO4, 3mM Mgcl2

، MmdNTP 4/4،0/2%Tween20

Insert red dye، stabilizer unit Ampliqon polymeras 0/2)

با ۱ لاندا از DNA استخراج‌شده و ۱ لاندا از هر پرایمر به غلظت ۱۰ پیکومولار داخل میکروتیوب‌های ۰/۲ RNAas/DNAas Free(BioFil کره جنوبی) ریخته شد و برای رساندن حجم نهایی به ۵۰ لاندا، به آن آب مقطر اضافه گردید. برای تکثیر ژن‌های موردنظر، از دستگاه ترموسایکلر Corbett CGI-96 (کشور آمریکا) با تنظیمات سیکل دمایی به‌صورت شوک حرارتی ۹۴درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و تعداد ۲۵ سیکل، به‌صورت ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای انلینگ ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه اعمال شد. طویل شدن نهایی نیز در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. محصولات PCR به‌وسیله الکتروفورز با استفاده از ژل ۱/۵٪ آگارز از یکدیگر جدا شدند؛ بدین صورت‌که ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۱/۵٪ در بافر ۰/۵X الکتروفورز گردید. برای رنگ‌دهی به ژل، به آن ۵ میکرولیترمحلول Gel Red (Biotium آمریکا)، اضافه و خوب هم زده شد. سپس در زیر نور ماورای بنفش در طول موج ۲۶۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده گردید.

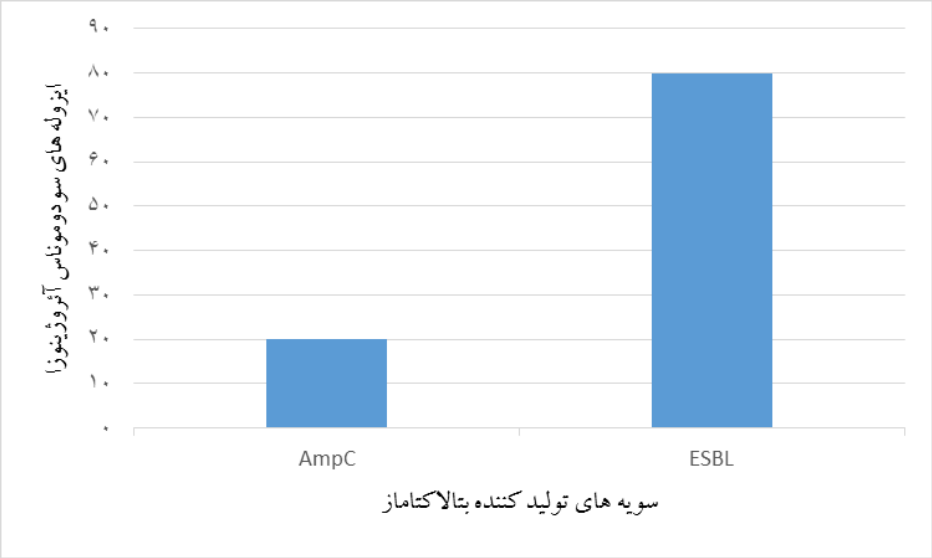
برای تعیین اندازه محصولات، از نشانگر (Marker) مولکولی فرمنتاز (Thermofisher دانمارک) با توالی ۱۰۰ جفت باز استفاده شد. در نهایت، از ژل حاصل به‌وسیله دستگاه ژل داک Gel Documentation System CCD (مدل CCD-Tab1 کیاژن ایران) عکس‌برداری شد (۲۵،۲۴).

نتایج به‌دست‌آمده از تعیین مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به روش فنوتیپی، با استفاده از نرم‌افزار WHOnet نسخه ۵ تجزیه و تحلیل شدند. برای این منظور از روش‌های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) استفاده گردید. همچنین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری K2 (برای مقایسه یافته‌های کیفی و تست مثبت مستقل برای مقایسه یافته‌های کمّی) آنالیز شدند. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ درنظرگرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، بعد از انجام تست‌های فنوتیپی و غربالگری اولیه، از۱۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوا* مورد بررسی، ۸۰ ایزوله (۸۰٪) مولد، ESBL و ۲۰ ایزوله (۲۰٪) از نظر فنوتیپی، *AmpC* در نظر گرفته شدند (نمودارشماره ۱).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017



نمودارشماره۱: میزان فراوانی سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های *ESBL* و *AmpC* در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به روش فنوتیپی.

با توجه به نمونه‌های به‌دست‌آمده، بیشترین نمونه‌های *سودوموناس* مولد آنزیم‌های *ESBL* و *AmpC*، از بیماران زن جداسازی شد و بیشترین سویه‌های *ESBL* و *AmpC* از بیماران بخش‌های ICU و اطفال جداسازی شدند.

همچنین بیشترین ایزوله‌های *ESBL*، از نمونه‌های ادرار و کشت خون و کمترین آن مربوط به نمونه‌های گرفته‌شده از ترشحات بود. ایزوله‌های *AmpC*، بیشترین مقدار را در نمونه‌های زخم و خون به خود اختصاص دادند (جدول شماره ۲).

جدول شماره۲: فراوانی ایزوله‌های *سودوموناس آئروزینوزا* مولد آنزیم *ESBL* و *AmpC* براساس تست‌های فنوتیپی در بیماران زن و مرد

جنسیت بیمار	*سودوموناس آئروژینوزا* (n=۱۰۰)	
	ESBL **(n=۸۰)**	***AmpC*** **(n=۲۰)**
زن	۵۹ (٪۷۳)	۱۱(٪۵۵)
مرد	۲۱ (٪۲۶)	۹(٪۴۵)

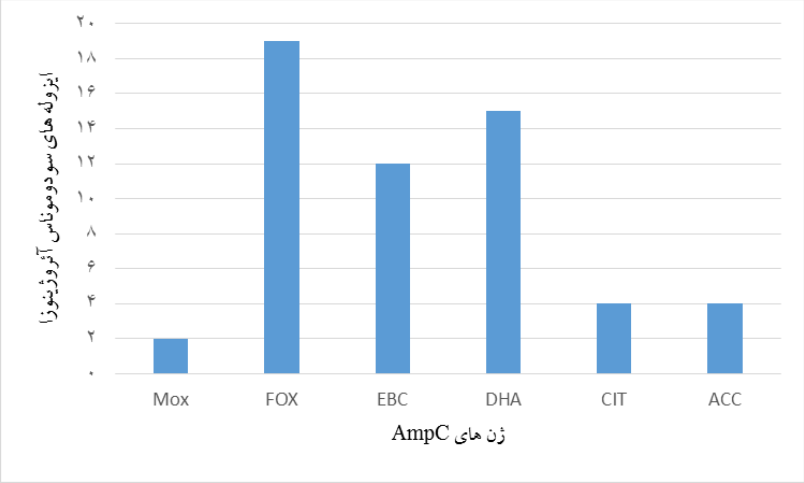
از مجموع ۱۰۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، ۲۰ ایزوله بالینی توسط تست‌های فنوتیپی دارای آنزیم *AmpC* تشخیص داده شدند. از این میان، ۱۹ ایزوله (٪۹۰) دارای ژن *Fox*، ۷ ایزوله (٪۳۵) دارای ژن *EBC*، ۴ ایزوله (٪۲۰) دارای ژن *ACC*، ۱۵ ایزوله دارای ژن *DHA*، ۴ ایزوله (٪۲۰) دارای ژن *CIT* و ۲ ایزوله (٪۱۰) از ایزوله‌ها دارای ژن *Mox* بودند (نمودار شماره ۲).

در این بین، بیشترین نمونه‌های حاوی ژن *Fox*، از بیماران بستری در بخش ICU و اطفال، از نمونه زخم جدا شد که بیشترین مقدار حاوی ژن‌های *EBC*، *EBC*، *ACC*، *DHA*، *CIT* و *Mox* بود (جدول شماره ۳).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017

جدول شماره ۳: فراوانی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد *ESBL* و *AmpC* براساس تست‌های فنوتیپی در نمونه‌های بالینی و بخش‌های بیمارستانی جداشده

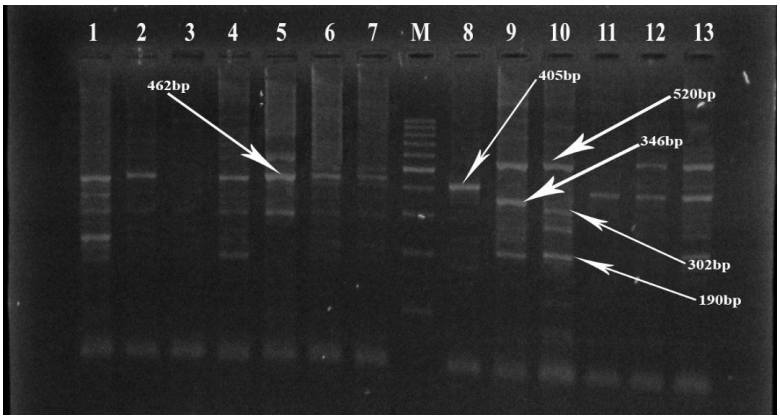
بخش جداشده	*سودوموناس آئروژینوزا* (n=۱۰۰)											
	ادرار		زخم		خون		ترشحات ریوی		شالدون کاتاتر		مایع مغزی-نخاعی	
	AmpC	*ESBL*	*AmpC*	*ESBL*	*AmpC*	*ESBL*	*AmpC*	*ESBL*	*AmpC*	*ESBL*	*AmpC*	*ESBL*
اطفال	۰	۲۱	۵	۲	۱	۶	۰	۱	۱	۹	۰	۱
ICU	۰	۶	۵	۹	۲	۱	۰	۰	۰	۲	۰	۰
داخلی-جراحی	۰	۰	۱	۳	۰	۹	۰	۰	۰	۱	۰	۰
P-ICU	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰
N-ICU	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
بیماران سرپایی	۰	۷	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
زنان	۰	۱	۰	۱	۱	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۲
خون‌شناسی	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۱	۰



نمودار شماره۲: میزان فراوانی ژن‌های *AmpC* در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به روش Multiplex PCR.

شکل شماره۱: غربالگری فنوتیپی اولیه ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد آنزیم *ESBL*. ایزوله‌های دارای قطر هاله بیشتر از ۵ میلی‌متر در اطراف دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰میکروگرم) و سیپروفلوکساسین(۳۰میکروگرم) در حضور دیسک‌های ترکیبی سفتازیدیم/کلاولانیک اسید و سیپروفلوکساسین/کلاولانیک اسید به عنوان *ESBL* در نظر گرفته شدند.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017



شکل شماره ۲: الکتروفورز محصولات تکثیر ژن‌های کروموزومی *AmpC* به روش MultiPlex PCR بر روی ژل آگارز ۳٪. چاهک‌های شماره‌های ۱، ۲، ٤، ٥، ٦، ۷، ۸، ۹، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ نمونه‌های مثبت از نظر وجود ژن‌های *Mox, CIT, DHA, ACC, EBC, EBC, Fox* که به ترتیب داری وزن مولکولی ۱۹۰، ۳۰۲، ۳٤٦، ٤٠٥، ٤٦٢ و ٥٢٠ جفت باز هستند.
شماره ۳ کنترل منفی و M مارکر ۱۰۰bp می‌باشد.

بحث

امروزه، تولید بتالاکتامازها توسط پاتوژن‌های گرم منفی، یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. بتالاکتامازها، آنزیم‌های باکتریایی هستند که قادرند آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز کرده و سبب بی‌اثر شدن این ترکیبات شوند (۲۷،۲۶). در طول ۲۰ سال گذشته، تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تولید شده، ولی با این وجود باکتری‌ها نیز بتالاکتامازهای جدیدی تولید کرده‌اند که باعث بی‌اثر شدن این آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. این‌طور تصور می‌شود که استفاده بیش از حد از یک آنتی‌بیوتیک در درمان بیماران، باعث تولید بتالاکتامازها توسط باکتری‌های مختلف می‌شود (۲۵). اولین و در واقع شایع‌ترین نوع مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های خاصی تحت عنوان بتالاکتاز بوده که این آنتی‌بیوتیک‌ها را غیرفعال می‌کند. براساس طبقه‌بندی اولیه Amber، ۴ کلاس A، B، C و D برای بتالاکتامازها در نظر گرفته شده است. بتالاکتامازهای کلاس C از سری بتالاکتامازهای سرینی هستند که به بتالاکتامازهای *AmpC* نیز شهرت دارند. این بتالاکتامازهای به‌دلیل انتقال کروموزومی و پلاسمیدی خود، توانسته‌اند در گروه بسیار بزرگی از خانواده انتروباکتریاسه ازجمله *سودوموناس آئروژینوزا* ایجاد مقاومت کنند (۲۶).

بتالاکتامازهای نوع *AmpC* اغلب به‌وسیله ژن‌های کروموزومی کد شده و در بسیاری از باسیل‌های گرم منفی نیز وجود دارند. آنزیم *AmpC* کروموزومی در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به مقدار کمی تولید می‌شود که جهش در آن نسبت به بتالاکتامازهای *AmpC* پلاسمیدی، میزان بیشتری را به خود اختصاص داده است (۲۷). همچنین از نظر خواص بتالاکتامازهای *AmpC* ، مقاومت به سفوکسیتین را به‌خوبی از خود نشان می‌دهند. بتالاکتامازهای نوع *AmpC* برای اولین‌بار از سویه‌های مقاوم *کلبسیلا پنومونیه* از شهر سئول گزارش شد (۲۸). علاوه بر بررسی‌های فنوتیپی، مطالعات ژنوتایپی، حاکی از پراکندگی بسیار گسترده و ناهمگون بین ژن‌های گروه *AmpC* می‌باشد. به‌طوری‌که ژن *FOX* به میزان ۹۵٪، ژن *EBC* به میزان ۳۵٪، ژن *ACC* به میزان ۲۰٪، ژن *DHA* به میزان ۷۵٪، *CIT* به میزان ۲۰٪ و *MOX* به میزان ۱۰٪ مشاهده شده است. با مقایسه نتایج مولکولی به‌دست‌آمده از نتایج بررسی ژن‌های کروموزومی با سایر مطالعات می‌توان به این نتیجه رسید که شیوع این ژن‌ها با سرعت زیادی در بین سویه‌های *سودوموناس آئروزینوزا* در حال گسترش است. این امر نه تنها به جنس سودوموناس؛ بلکه در سایر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه هم به‌وضوح دیده می‌شود؛ زیرا این گروه ژن‌های کروموزومی *AmpC* را می‌توان در جنس‌هایی از قبیل *اشرشیاکلی، انتروباکتر، اسینتوباکتر بومانی، کلبسیلا پنومونیه* مشاهده کرد. صحت این موضوع زمانی محکم‌تر شد که اولین سویه‌های حامل این گروه از ژن‌ها، برای نخستین‌بار در *کلبسیلا پنومونیه* مشاهده گردید و در مدتی کوتاه این مقاومت در سایر جنس‌های این خانواده نیز پخش شد (۲۸). در این مطالعه، حدود ۱۰٪ از ایزوله‌های به‌دست‌آمده، حاوی همه ژن‌های گروه *AmpC* بودند.

در مطالعه‌ای که رائفی و همکاران بر روی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* انجام دادند، آنزیم *AmpC* در این ایزوله‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت که حدود ۵٪ از همه ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* دارای همه ژن‌های گروه *AmpC* بودند که این نتایج با یافته مطالعه حاضر همخوانی داشت (۱۳). عدم وجود شباهت در نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق با مطالعات دیگر را می‌توان به تغییر سویه متناسب با موقعیت جغرافیایی نسبت داد، به‌طوری‌که حتی در برخی موارد ممکن است گزارشهای ارائه‌شده از بیمارستان‌های مختلف یک شهر نیز کاملاً با هم متفاوت باشند که این موضوع اهمیت وجود مطالعات مداوم و گسترده را نشان می‌دهد (۲۹). از طرفی، تعداد ارگانیسم‌های قادر به تولید آنزیم‌های *AmpC*، در سویه‌های سودوموناس در حال گسترش بوده که این امر به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مسائل در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری مطرح است. علاوه بر این، در گزارشهای به‌دست‌آمده از ایران، اشاره کمتری به حضور آنزیم *AmpC* در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* وجود دارد که همه این موارد، حاکی از نیاز به مطالعه بیشتر بر روی ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع *AmpC* می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، در بسیاری از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مورد بررسی، حضور همه ژن‌های عامل مقاومت در یک ایزوله مشاهده نشد. بنابراین، می‌توان امید داشت که آنزیم‌های بتالاکتامازی با حداکثر توان در بیشتر ایزوله‌ها کد نمی‌شوند. با همه این موارد باید سعی شود تا از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، جلوگیری و آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف بدون معاینه دقیق و بررسی‌های آزمایشگاهی حساس تجویز نشوند تا بتوان شاهد کاهش و کنترل مقاومت در خانواده *انتروباکتریاسه* بود.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017

References:

1. Ghajavand H, Havaei A, Nasr Esfahani B, Fazeli H, Moghim Sh. Frequency of MDR Acinetobacter baumannii Isolates in Intensive Care Units (ICU) of Isfahan Hospitals by molecular method and their Antimicrobial Resistance Patterns. J Isfahan Med Sch 2014;32(295):40-55. [Full Text in Persian]

2. Akhavan Tafti F, Zandi H, Vakli M, Mousavi M, Zarei M. Frequency of β-lactamase and metallo-β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn wounds in Yazd burn hospital during 2011-2012. Feyz 2014;18(2):167-74. [Full Text in Persian]

3. Wong YP, Chua KH, Thong KL. One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection. J Microbiol Methods 2014;107:133-7.

4. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and beta-lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 2013;57(11):5247-57.

5. Rezaee MA, Pajand O, Nahaei MR, Mahdian R, Aghazadeh M, Ghojazadeh M, et al. Prevalence of Ambler class A beta-lactamases and ampC expression in cephalosporin-resistant isolates of Acinetobacter baumannii. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;76(3):330-4.

6. Ben RJ, Yang MC, Hsueh JC, Shiang JC, Chien ST. Molecular characterisation of multiple drug-resistant Acinetobacter baumannii isolates in southern Taiwan. Int J Antimicrob Agents 2011;38(5):403-8.

7. Tsutsumi Y, Tomita H, Tanimoto K. Identification of novel genes responsible for overexpression of ampC in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Antimicrob Agents Chemother 2013;57(12):5987-93.

8. Willard KE, Moody JA, Peterson LR. A general ampC active site oligonucleotide probe for gram-negative rods. Mol Cell Probes 1991;5(2):97-102.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017

9. Hosseini Jazani N, Omrani MD, Yekta Z, Nejadrahim R, Afshar Yavari Sh, Zartoshti M. Plasmid profile of pseudomonas aeruginosa and its relation with antibiotic resistance in hospital isolates. J Kerman Univ Med Sci 2008;15(1):9-17. [Full Text in Persian]

10. Cholley P, Ka R, Guyeux C, Thouverez M, Guessennd N, Ghebremedhin B, et al. Population structure of clinical Pseudomonas aeruginosa from West and Central African countries. PLoS One 2014;9(9):e107008.

11. Lahiri SD, Johnstone MR, Ross PL, McLaughlin RE, Olivier NB, Alm RA. Avibactam and class C beta-lactamases: mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. Antimicrob Agents Chemother 2014;58(10):5704-13.

12. Toval F, Guzman-Marte A, Madriz V, Somogyi T, Rodriguez C, Garcia F. Predominance of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates carrying blaIMP and blaVIM metallo-beta-lactamases in a major hospital in Costa Rica. J Med Microbiol 2015;64(Pt 1):37-43.

13. Rafiee R, Eftekhar F, Tabatabaei SA, Minaee Tehrani D. Prevalence of Extended-spectrum and Metallo Beta-Lactamase production in AmpC Beta-Lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolates from burns. Jundishapur J Microbiol 2014;7(9):e16436.

14. Lahiri SD, Mangani S, Jahic H, Benvenuti M, Durand-Reville TF, De Luca F, et al. Molecular basis of selective inhibition and slow reversibility of avibactam against Class D Carbapenemases: A structure-guided study of OXA-24 and OXA-48. ACS Chem Biol 2015;10(2):591-600.

15. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D beta-lactamases: Are They All Carbapenemases? Antimicrob Agents Chemter 2014;58(4):2119-25.

16. Fajardo A, Hernando-Amado S, Oliver A, Ball G, Filloux A, Martinez JL. Characterization of a novel Zn dependent intrinsic imipenemase from Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother 2014;69(11):2972-8.

17. Zubair M, Malik A, Ahmad J. Microbiology of diabetic foot ulcer with special reference to ESBL infections. Am J Clin Experimen Med 2015;3(1):6-23.

18. Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, et al. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in Serratia marcescens isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2000;44(11):3061-8.

19. Bermudes H, Arpin C, Jude F, El-Harrif Z, Bébéar C, Quentin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16(7):523-9.

20. Filloux A, Ramos J-L. Pseudomonas methods and protocols. New York: Humana Press; 2014.

21. Aghazadeh M, Hojabri Z, Mahdian R, Nahaei MR, Rahmati M, Hojabri T, et al. role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY(-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis and burn patients. Infection, genetics and evolution. Infect Genet Evol 2014;24:187-92. [Full Text in Persian]

22. Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents 2012;40(2): 168-72.

23. Tam VH, Schilling AN, LaRocco MT, Gentry LO, Lolans K, Quinn JP, et al. Prevalence of AmpC over-expression in bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect 2007;13(4):413-8.

24. Soleimani N, Aganj M, Ali L, Shokoohizadeh L, Sakinc T. Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic E. coli isolated from Iranian hospital. BMC Res Notes 2014;7:842.

25. Hedayatianfard K, Akhlaghi M, Sharifiyazdi H. Detection of tetracycline resistance genes in bacteria isolated from fish farms using polymerase chain reaction. Vet Res Forum 2014;5(4):269–75.

26. Babaii Kochaksaraii M, NasrolahiOmran A, Javid N, Shakeri F, Yazdi M, Ghaemi EA. Extended spectrum beta lactamase producing E. coli isolated from Gorgan, North of Iran. Med Lab J 2012;6(1):51-8. [Full Text in Persian]

27. Gomez M, Guío L, Hernández JL. Bacteriemias por enterobacterias productoras de beta-lactamasas (BLEE, AmpC y carbapenemasas) asociación con los cuidados sanitarios y los pacientes oncológicos. Revista Española de Quimioterapia 2015;28(5):256-62.

28. van Hoek AH, Veenman C, van Overbeek WM, Lynch G, de Roda Husman AM, Blaak H. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. Int J Food Microbiol 2015;204:1-8.

29. Wassef M, Behiry I, Younan M, El Guindy N, Mostafa S, Abada E. Genotypic Identification of AmpC Beta-lactamases production in gram-negative bacilli isolates. Jundishapur J Microbiol 2014;7(1):e8556.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 13:07 IRDT on Tuesday June 27th 2017