مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره دهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۱۸۹ الی ۱۹۸

مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های بالینی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی

دکتر عباسعلی ایمانی فولادی[1]، زهرا رستمی[2]، دکتر رضا شاپوری[3]

[1] استادیار میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

[2] نویسنده مسئول: کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

Email: faranak_612001@yahoo.com

[3] استادیار میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: جداسازی ژن های SHV و TEM در سودوموناس آئروژینوزاهای مولد ESBL و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، اطلاعات مفیدی درباره اپیدمیولوژی و فاکتورهای خطر دخیل در این عفونت ها را فراهم می آورد. در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های بالینی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در مطالعه توصیفی- تحلیلی حاضر ۱۱۰ سویه ی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های مختلف بالینی با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. الگوی مقاومت آنتی میکروبی به روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) تعیین شد. سپس بررسی فنوتیپی ESBL با استفاده از روش دیسک ترکیبی انجام گرفت. در این روش از دیسک های سفوتاکسیم و سفتازیدیم به تنهایی و در ترکیب با کلاولانیک اسید استفاده شد. از نظر ژنوتیپی ژن های بتالاکتاماز SHV و TEM در سویه های فوق با روش PCR بررسی گردید.

یافته ها: در این مطالعه به ترتیب بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک های کوتریموکسازول و آموکسی سیلین ۹۶/٤٪ و ۹۲/۷٪ و کمترین مقاومت به آمیکاسین ۱۷/۳٪ نشان داده شد. در بررسی ژنوتیپی با انجام آزمون PCR از ۱۶ سویه فنوتیپ مثبت، ۳۷/۵٪ شامل ژن SHV و ۱۲/۵٪ ژن TEM و ۱۲/۵٪ دارای هر دو ژن SHV و TEM بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که اغلب نمونه ها مقاوم به دارو هستند و در میان سویه های تولید کننده ESBL فراوانی ژن های SHV بیشتر از TEM یافت شد. سویه های دارای ژن SHV مقاوم به سفتازیدیم (۳۷/۵٪)و سویه های دارای ژن TEM مقاوم به سفتازیدیم (۱۲/۵٪) بوده است و نتایج بیانگر این است که ژن های SHV و TEM در ایجاد مقاومت نسبت به سفتازیدیم در مقایسه با ایجاد مقاومت به سفوتاکسیم نقش بیشتری دارند.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا؛ مقاومت آنتی بیوتیکی؛ بتالاکتامازهای وسیع الطیف؛ SHV؛ TEM

دریافت: ۸۹/۶/۱۱ **پذیرش:** ۸۹/۹/۲۷

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری بیماریزا فرصت‌طلب است که عاملی عمده در بروز مرگ و میر در بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می‌شود. مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در این باکتری سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های آن می‌گردد. نوعی از مقاومت به واسطه تولید آنزیم‌هایی به نام بتالاکتامازها صورت

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

می‌گیرد، که عامل مقاومت در برابر بتالاکتام‌ها است [۱]. بتالاکتام‌ها داروهای مناسبی جهت درمان سودوموناس آئروژینوزاها بودند اما بعد از مدتی برخی از باکتری‌ها با تولید بتالاکتاماز به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند. این آنزیم‌ها بر اساس عملکردشان به ٤ کلاس ۱، ۲، ۳ و ٤ تقسیم می‌شوند که کلاس ۲ به ۸ زیر گروه ۲a، ۲b، 2br، 2be، 2d،۲c، ۲e، ۲f طبقه بندی می‌شوند. این آنزیم‌ها بر اساس ساختمان مولکولی در ٤ گروه A، B، C، D قرار گرفتند، کلاسها A، C و D به وسیله مکانیسم سرین عمل می کنند در صورتی که کلاس B برای فعالیت خود نیازمند عنصر روی است. امروزه ۵ نوعESBL از کلاس A (SHV، TEM، PER،VEB وGES/IBC) و کلاس D (OXA) در سودوموناس آئزوژینوزا جداسازی شده است [۲]. بتالاکتامازهای طیف گسترده گروهی از آنزیمهای ناشی از پلاسمید هستند که قادر به تخریب سفالوسپورین‌های با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم هستند [٤،۳] و عمدتا توسط مهارکننده های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می شوند. ESBLها از بتالاکتامازهای کلاس A گروه ۲be هستند. بیشتر این آنزیم‌ها مشتقات بتالاکتامازهای TEM وSHV با یک یا چند تغییر در اسیدهای آمینه آنها می باشند [۶،۵].

آنزیم SHV در نمونه‌های بالینی با فراوانی زیاد نسبت به انواع دیگر از ESBLها یافت می شوند. با جایگزینی اسیدهای آمینه در جایگاه فعال این آنزیم انواع مختلفی از بتالاکتاماز SHV به وجود آمده به طوری که تاکنون بیش از ۵۰ نوع از آنزیم SHV در جهان یافت شده است. بتالاکتامازهای مشتق از SHV در انتروباکتریاسه‌ها و شیوع آن در سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر گزارش شده است [۸،۷].

با جایگزینی اسیدهای آمینه در جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز TEM-1 انواع مختلفی از بتالاکتاماز TEM به وجود آمده به طوری که تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع آنزیم TEM مورد شناسایی قرار گرفته‌اند و شیوع آنها در نواحی مختلف دنیا بصورت متفاوت گزارش شده است. بتالاکتاماز TEM-1، اولین بتالاکتامازی بود که به وسیله پلاسمید در انتروباکتریاسه‌ها کد شد و سایر باکتری ها از جمله سودوموناس آئروژینوزا نیز قادر به تولید آن می‌باشند [۱۱-۹].

این ارگانیسم به علت افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی خصوصاً به صورت چند دارویی مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از آنها ایجاد کرده است. بررسی ها نشان می‌دهد که بین مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک‌ها و مصرف آنتی بیوتیک‌ها رابطه وجود دارد [۱۳،۱۲]. ژن های ESBLs با ایجاد مقاومت‌های چند گانه به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط دارند، به طوری که بروز و انتشار ژن‌های مختلف ESBLs به علت افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، خصوصاً به صورت چند دارویی، مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت های ناشی از آنها ایجاد کرده است [۱۲]. در هر حال علیرغم هزینه های بالای روش‌های ژنوتیپی در مقایسه با روش‌های فنوتیپی تشخیص مقاومت، گسترش روش‌های مولکولی منجر به درمان سریع و مؤثر آنان و جلوگیری از گسترش ایزوله های مقاوم باکتری‌ها می‌گردد. مطالعه حاضر برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی انجام گرفت.

روش کار

ایزوله های باکتری

این مطالعه از نوع تحلیلی-توصیفی است. در طی یک سال تعداد ۱۵۰۰ نمونه کلینیکی مختلف از جمله زخم، ادرار، خون، بافت، خلط، گوش، مدفوع و سایر موارد (تراشه، استخوان، پلور، چست تیوپ) از بخش‌های مختلف مراکز آموزشی درمانی تهران جمع‌آوری

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

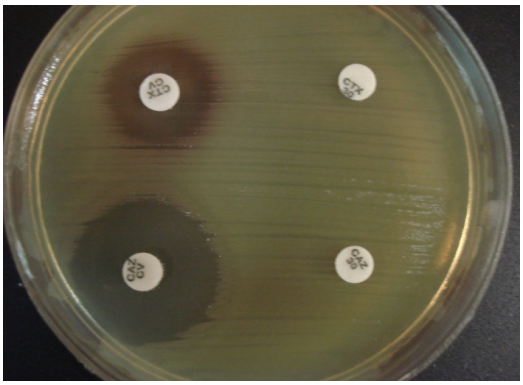
شدند، که از بین آنها ۱۱۰ ایزوله باکتری سودوموناس آئروژینوزا بود که بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی مختلف از جمله اکسیداز، تولید پیگمان، تخمیر TSI، تست OF هوازی مثبت و بی‌هوازی منفی مورد شناسایی قرار گرفتند. سویه‌ها در محیط نوترینت براث در دمای ۷۰°C- حاوی ۲۰٪ گلیسرول ذخیره گردید.

تعیین مقاومت آنتی میکروبی

این تست به روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) بر اساس استانداردهای CLSI[1] انجام شده ابتدا پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار (شرکت Merck آلمان) سوسپانسیون میکروبی استاندارد با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مزبور دیسک های آنتی بیوتیکی (شرکت Mast انگلستان) مورد استفاده شامل: سفتازیدیم (۳۰ µg)، کوتریموکسازول (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، نورفلوکساسین (۱۰µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، جنتامیسین (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، آموکسی سیلین (۱۰µg)، سفالکسین (۳۰ µg). به فاصله حداقل ۲ سانتی متر از یکدیگر قرار داده شده پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ °C قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج آن ثبت شد. از سویه سودوموناس آئروژینوزای ATCC ۲۷۸۵۳ جهت کنترل مثبت استفاده گردید [۱٤].

تأیید فنوتیپی ESBL با روش دیسک ترکیبی [2]

در روش دیسک ترکیبی از دیسک‌های ۳۰ میکروگرمی سفتازیدیم و سفوتاکسیم در مجاورت دیسک ۱۰ میکروگرمی کلاولانیک اسید (شرکت Mast انگلستان) در محیط مولر هینتون آگار (شرکت Merckآلمان) استفاده شد. در صورتی که قطر هاله عدم رشد در کنار دیسک‌های شامل ترکیب آنتی‌بیوتیک با کلاولانیک اسید ۵ میلی‌متر بیشتر از قطر هاله عدم رشد در کنار دیسک مربوطه به تنهایی باشد مولد بتالاکتاماز طیف وسیع در نظر گرفته می شود [۱۵].



شکل ۱. روش دیسک ترکیبی دیسک های سفتازیدیم و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرمی) به همراه سفتازیدیم/ کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم/ کلاولانیک اسید (۳۰/۱۰میکروگرمی) روی محیط مولر هینتون آگاردر فاصله cm ۲ برای شناسایی ESBLs در سودوموناس آئروژینوزا، مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA و روش ژنوتیپی تعیین ESBL

به منظور استخراج DNA ژنومیک جهت انجام PCR از روش ساده جوشاندن طبق دستور العمل زیر استفاده شد: [۱۶] ابتدا حدود یک لوپ از کلنی‌های خالص سودوموناس آئروژینوزا در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB[3] مایع (شرکت Merck آلمان) تلقیح و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری‌های رشد یافته در میکروتیوپ استریل ریخته و در g ۷٤۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی کاملاً تخلیه و با بافر TE استریل (۲ بار و هر بار ۲۰۰µL) شست شو داده و در g × ٤۸۰۰ به مدت ۶ دقیقه سانتریفوژ شد. آنگاه ۲۰۰µL آب مقطر دیونیزه به همراه ۱۰µL پروتئیناز K به رسوب اضافه شد و محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در فور ۶۰°C قرار گرفت و در حرارت ملایم به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد. سپس

[1] Clinical and Laboratory Standard Institute
[2] Combination disk
[3] Luria Bertini

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

مجدداً در دور g × ٤٨٠٠ به مدت ۶ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی که حاوی ژنوم باکتری است با سمپلر به میکروتیوپ استریل جدید انتقال داده شد و در دمای ۲۰°C- ذخیره گردید. به منظور بررسی کمی DNA استخراج شده از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ استفاده شد. جداسازی ژن های SHV و TEM با استفاده از جفت پرایمرها (شرکت سیناژن) و دماهای ذکر شده در جدول ۱ انجام گردید [۲]. با ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱میکرولیتر $MgCl_2$ (۲/۵mM)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰pmol)، ۱ میکرولیتر dNTPs (۲/۵mM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵U)، Master mix با حجم نهایی ۲۵ µL تهیه شد، سپس ۲ میکرولیتر DNA اضافه گردید. از کلبسیلا پنومونیه ۷۸۸۱ (انستیتو پاستور ایران) به عنوان سوش کنترل مثبت استفاده گردید. سپس نمونه‌ها در کنار مارکر ۱۰۰ bp برروی ژل ۱/۵٪ آگاروز الکتروفورز شده و رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید مشاهده شد (جدول ۱).

ژن SHV و نمونه های زخم، ادرار، خون، گوش و مدفوع دارای درصد برابر از ژن های TEM یافت شد. در مقایسه بین نمونه های بالینی و ژن SHV از آزمون فیشر با $p \leq ۰/۰۵$ و ژن TEM نیز از آزمون فیشر با $p \leq ۰/۰۵$ استفاده شده که مقایسه بین نمونه های بالینی و ژن SHV معنی‌دار ولی در مقایسه نمونه های بالینی و TEM رابطه معنی داری مشاهده نشد. در بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۱۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا بیشترین مقاومت مربوط به سولفومتوکسازول ۹۶/٤٪ و آموکسی‌سیلین ۹۲/۷٪ و کمترین مقاومت مربوط به آمیکاسین ۱۷/۳٪ یافت شد و سایر آنتی بیوتیک ها به ترتیب شامل: سفالکسین ۹۰/۹٪، تتراسایکلین ۸۶/٤٪، سفتریاکسون ۶۶/٤٪، سفوتاکسیم ۴۳/۶٪، جنتامایسین ۲۵/۵٪، سیپروفلوکساسین ۲۰/۹٪، سفتازیدیم ۲۰/۹٪، نورفلوکساسین ۱۹/۱٪ بودند. در بررسی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی ۱۳ ایزوله (۱۱/۸٪) واجد فنوتیپ سفتازیدیم و ۱۰ ایزوله فنوتیپ سفوتاکسیم (۹/۱٪) و در ۷ ایزوله (۶/٤٪) هر دو

جدول ۱. توالی های پرایمر و دماهای مورد استفاده در آزمون PCR ژن های SHV و TEM

پرایمر	توالی پرایمر ´۳ ⟵ ´۵	PCR			سیکل	ژن
		واسرشت شدن	اتصال	طویل شدن		
SHV-A SHV-B	AAGATCCACTATCGCCAGCAG ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG	۹٤ ۱ دقیقه	۶۸ ۱ دقیقه	۹٤ ۱ دقیقه	۳۵	blaSHV ۲۳۱bp
TEM-A TEM-B	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	۷۲ ۱ دقیقه	۵۰ ۱ دقیقه	۷۲ ۱ دقیقه	۳۵	blaTEM ۸۶۱bp

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ تجزیه و تحلیل شد و از دو آزمون کای اسکوئر و فیشر استفاده شد. مقدار آماری آزمون ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

یافته ها

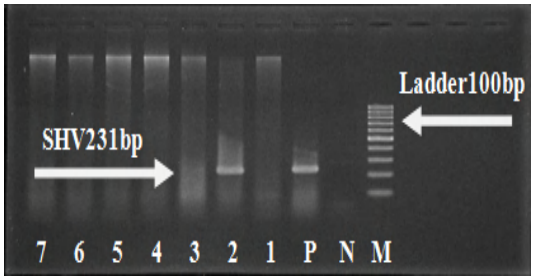
از میان سویه های جدا شده بیشترین مربوط به زخم بودند. در نمونه های ادرار و زخم بیشترین درصد

فنوتیپ یافت شد. در بررسی ژنوتیپی با انجام آزمون PCR از ۱۶ سویه فنوتیپ مثبت، (۳۷/۵٪) شامل ژن SHV و (۱۲/۵٪) ژن TEM و (۱۲/۵٪) هر دو ژن را دارا بودند (شکل‌های ۱و۲).

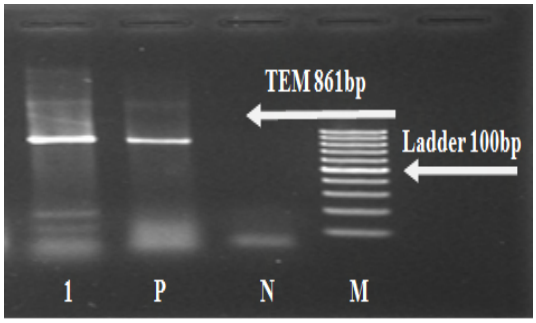
در مقایسه‌ی فنوتیپ (دیسک های ترکیبی سفوتاکسیم و سفتازیدیم همزمان با هم) و ژن های SHV و TEM به تنهایی، ایزوله های که از نظر آزمایش فنوتیپی مثبت نشان داده شد، از نظر ژنوتیپی درصد فراوانی ژن‌های SHV و TEM به میزان ۹/۱٪ و ۲۰٪

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

یافت شد و ایزوله‌هایی که از نظر هر دو فنوتیپ منفی بودند از لحاظ ژنوتیپی، فراوانی ژن SHV، ۷۲/۷٪ و ژن TEM، ۶۰٪ مشخص شد. ایزوله‌هایی که دیسک ترکیبی CAZ مثبت در مجاورت با دیسک ترکیبی CTX منفی را دارا بودند در بررسی ژنوتیپی فراوانی ژن SHV به میزان ۱۸/۲٪ و ژن TEM به میزان ۲۰٪ یافت شد. ایزوله هایی که تنها دارای دیسک ترکیبی CTX مثبت در مجاورت با دیسک ترکیبی CAZ منفی بودند از نظر ژنوتیپی ژن SHV و TEM فاقد فراوانی بودند. در مقایسه فنوتیپ با ژن SHV به تنهایی، از آزمون فیشر با $p\leq ۰/۰۵$ استفاده شده و رابطه معنی دار است ولی در مقایسه با ژن TEM به تنهایی از آزمون فیشر با $p\leq ۰/۰۵$ رابطه معنی‌دار یافت نشد (نمودار۱ و شکل ۱و۲).



شکل۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن SHV در باند ۲۳۱bp بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ M- مارکر ۲۳۱ bp، N-کنترل منفی، P-کنترل مثبت، ۲- سویه ژنوتیپ مثبت دارای ژن SHV، ۱و۳ تا ۷ سویه های ژنوتیپ منفی فاقد ژن SHV

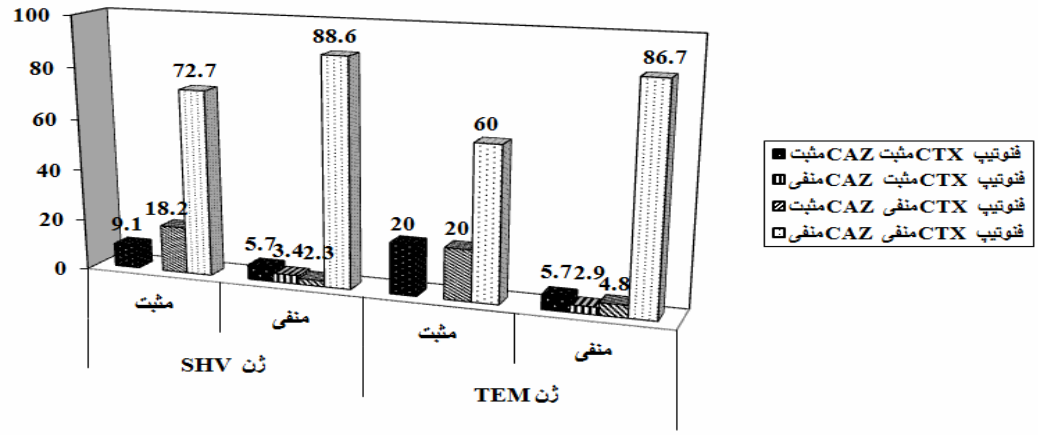


شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR ژن TEM در باند ۸۶۱ bp بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ M- مارکر ۲۳۱ bp، N-کنترل منفی، P-کنترل مثبت، ۱- سویه ژنوتیپ مثبت دارای ژن TEM

بحث

افزایش مصرف داروهای بتالاکتام وسیع الطیف و بستری طولانی مدت بیماران سبب انتشار باکتری‌های تولیدکننده‌ی ESBL می‌شوند. نکته قابل ذکر در مورد نوع نمونه و فراوانی ژن‌های مورد مطالعه اینکه سویه‌های جدا شده از نمونه های زخم و ادرار دارای ژن بیشتری بودند که با مطالعه شاهچراغی در تهران همخوانی دارد اما اثبات رابطه بین ژن و نوع نمونه نیاز به مطالعه وسیع تری دارد [۱۷].

در این مطالعه درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، آمیکاسین، به ترتیب ۲۵/۵٪، ۲۰/۹٪، ۲۵/۵٪، ۱۷/۳٪ یافت شد. در حالی که در مطالعه آی بینو[1] و همکارانش درصد



نمودار ۱. مقایسه میان فنوتیپ و ژن های SHV و TEM

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب ۲۰/۶٪، ۵۹/۸٪، ۵۷/۷٪، ۲۱/۶٪ بود که کاهش مقاومت را نسبت به این تحقیق مشخص نمود[۱۵]. همچنین در بررسی‌های انجام شده توسط مهاجری در سال ۸۱ در کرمانشاه درصد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب ۵۰٪، ۳۸٪، ۵۲٪، ۳۸٪ بوده که میزان مقاومت در مطالعه ما نسبت به سال ۸۱ کاهش نشان داد [۱۸]. که این امر را می‌توان احتمالاً حاصل کنترل مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و رعایت موارد بهداشتی توسط پرسنل دانست. در مطالعات انجام گرفته در کشورهای مختلف به میزان مقاومت به سفتازیدیم ۹٪، ۱۵٪ و ۳۵٪ [۲۳-۱۹]. به سیپروفلوکساسین ۹٪، ۲۳٪ و ۹۱/۷٪ [۲٤،۱۹]، به جنتامایسین ۵۰٪، ۳۱٪ و ۹۶/۶٪، [۲۳،۲۲،۱۸،۱۷]، به آمیکاسین ۹٪، ۹٪ و ۲۵٪ [۲۵،۲۳،۲۱،۲۰،۱۹] بوده که در مقایسه با این مطالعه درصد مقاومت در برخی مطالعات پایین‌تر می باشد. می‌توان گفت که میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای توسعه یافته نسبت به کشورهای در حال توسعه و کشورهای جهان سوم پایین‌تر است. در همین رابطه می‌توان به اجتناب از تجویز بی‌مورد آنتی‌بیوتیک‌ها، تجویز کوتاه مدت آنتی بیوتیک های وریدی برای پیشگیری از عفونت در بیماران پرخطر و نیز استفادهٔ محافظه‌کارانه از وسائل و تجهیزات پزشکی اشاره کرد.

نتایج حاصل از تست فنوتیپی در این مطالعه از مجموع ۱۱۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا اخذ شده، شیوع سویه های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در ۱۶ ایزوله مثبت بوده اما در بررسی انجام شده توسط آی بینو و همکارانش، ۹ ایزوله مثبت یافت شد[۱۵]. در مطالعه‌ای که در سال های اخیر در ایران بر روی سودوموناس آئروژینوزاهای مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف انجام شده نتایج به شرح زیر می باشد: در سال ۲۰۰۸ شکیبایی و همکاران [۲۶]، از ۱۲۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا ٤۱ مورد (۳٤٪) و میرصالحیان [۲۷]، نیز ٤۰ سویه (٤۰٪) را مولد ESBL مثبت و شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۶۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا ۲۳٤ سویه (۳۹٪) را مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف گزارش کردند [۲۸]. این نتایج نسبت به مطالعه حاضر از فراوانی بیشتری برخوردار هستند این آمار بالا به نظر می رسد به دلیل ظهور باکتری های مقاوم غالب و مولد ESBL و الگوی درمانی وابسته به سفالوسپورین های وسیع الطیف در مواجهه با بیماری ها منجر به افزایش باکتری های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف گردیده است. تشخیص فنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در سودوموناس آئروژینوزا به دلایل مختلف از جمله وجود AmpC کروموزومی و مقاومت نسبت به کلاولانات و مکانیزم های دیگر مقاومت مثل نفوذپذیری کم غشا و وجود پمپ‌های تراوشی[1] باعث ایجاد نتایج کاذب می‌گردد، لذا انجام روش های مولکولی از قبیل PCR به دلیل حضور سایر ژن های بتالاکتامازی ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه بر روی سایر باکتری‌ها از جمله اشریشیاکلی توسط متر[2] و همکارانش در لبنان، ژن SHV ۲۱٪، ژن TEM ۶۱٪، در انتروباکتریاسه ها توسط تاشی[3] و باهاره[4]، ۷٤/۳٪ ژن SHV و ۵۲/۷٪ ژن TEM و سایر گونه های کلبسیلا در سال ۲۰۰۸ توسط جین[5] ومونال[6] در هند ۲۰/۳٪ دارای ژن SHV و ٤۸/٤٪ دارای ژن TEM بودند[۲۹،۳۰،۳۱] که در مقایسه با مطالعه حاضر که بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا است، درصد ژن SHV در انتروباکتریاسه افزایش و در اشریشیاکلی و کلبسیلا کاهش را نشان داد ولی ژن TEM در این باکتری ها نسبت به سودوموناس آئروژینوزا افزایش را نشان داد. در این مطالعه از بین سویه های فنوتیپ مثبت ۱۲/۵٪ دارای

[1] Efflux Pumps
[2] Matar
[3] Tashi
[4] Bahar
[5] Jain
[6] Monal

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

هر دو ژن SHV و TEM و۶۲/۵٪ فاقد هر دو ژن بودند. سویه هایی که شامل ژن SHV و TEM مقاوم به سفوتاکسیم هستند به ترتیب ۲۵٪ و ۶/۲۵٪ و سویه های دارای ژن SHV و TEM مقاوم به سفتازیدیم ۳۷/۵٪ و ۱۲/۵٪ یافت شد که مشخص کرد ژن های SHV و TEM مقاوم به سفتازیدیم بیشتر از ژن های مقاوم به سفوتاکسیم است.

نتیجه گیری

امروزه مساله مقاومت به داروهای بتالاکتام و مقاومت به سفالوسپورین های وسیع الطیف یک معضل جدی رو به پیشرفت است که به زودی جهت جایگزینی آن ها، به آنتی بیوتیک های جدید نیاز خواهیم داشت. در مطالعه حاضر بروز ژن های SHV و TEM در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا گزارش شد که بالا بودن ژن SHV را نسبت به ژن TEM نشان داد.

پیشنهادات

با توجه به فراوانی باسیل‌های گرم منفی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف و مقاومت بالای آنها در برابر اکثر داروهای طیف وسیع، به نظر می‌رسد که شناسایی سویه های مولد ESBL بایستی در برنامه روزانه آزمایشگاه‌های میکروب شناسی در مورد باسیل های گرم منفی از جمله اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا گنجانده شوند. با تشکیل کمیته‌های تجویز آنتی‌بیوتیک در بیمارستان‌ها، با جدیت بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌های طیف وسیع در بیمارستان ها نظارت شود.

References

1- Montie TC, Drake D, Sellin H, Slater O , Edmonds S. Motility, virulence and protection with flagella vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection. Antibiot Chemother. 1987; 39, 233-48.

2- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. *Ambler* class A extended-spectrum beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Aug; 47(8): 2385-92.

3- Knothe H, Shah P. Kremery V. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. Infection. 1983 Nov-Dec; 11(6): 315-7.

4- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended spectrum β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1991 Sep; 35(9): 1697-1704.

5- Howard C, Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard1 PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β-Lactamases in nosocomial infection associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. Antimicrob Agents and Chemother. 2002 Mar; 46(3): 659-664.

6- Bradford, PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001 Oct; 14(4): 933-51.

7- Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant β-lactamases(SHV-10) derived from an SHV-5 variant. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Apr; 41(4): 838-840.

8- El Harrif-Heraud Z, Arpin C, Benliman S, Quentin C. Molecular epidemiology of nosocomial outbreak due to SHV-4 producing strain of Citrobacter diversus. J Clin Microbiol. 1997 Oct; 35 (10): 2561-2567.

9- Burn-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Asquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant Kelbsiella pneumoniae. Lancet. 1987; 11:302-306.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

10- Poirl L, Mammeri H, Nordmann P. TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type beta-lactamases from Enterobacter aerogenes. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Dec; 48 (12): 4528-4531.
11- Nordmann P, Guibert M. Extended spectrum ß-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 1998 Aug; 42(2):128-131.
12- Douglas MW, Mulholland K, Denyer V, Gottlieb T. Multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa outbreak in a burns unit-an infection control study. Burns. 2001 Mar; 27(2): 131-5.
13- Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC and et al. Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by Pseudomonas aeruginosa. Microb Drug Res. 2005 Spring; 11(1): 68-74.
14- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing: Document M10-S15. CLSI, Wayne, PA, USA, 2005.
15- Aibinu I, Nwanneka T, Odugbemi T. Occurrence of ESBL and MBL in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa From Lagos, Nigeria. Journal of American Science. 2007; 3(4):81-85.
16- Frederick M. Ausubel, Roger B, Robert E. Kingston, David D. Moore JG, et al. Current protocols in molecular biology. Wiley, John & Sons, USA. 2003; p: 218-26.
17- Shahcheraghi F, Nikbin V, Shoraj F. Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamases from clinical specimen isolated at two hospitals of Tehran. Iranian Journal of Microbiology. 2008; 4: 21-27. (Fulltext in Persian)
18- Mohajeri P. Determination suspceptibility and antibiotic resistance from clinical different spciemen at Kermanshah therapeutic. Kermanshah University Medical Journal. 2003; 4: 11-20. (Fulltext in Persian)
19- Shawar RM, Macleod DL, Garber RL, Burns JL. Activities of Tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. Antimicrobial Agent and Chemother. 1999 Dec; 43(12): 2877-80.
20- Karakoc B, Gereceker AA. In vitro activities of various antibiotics alone and in combination with amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 1995 Oct; 36(4): 707-11.
21- Kato K, Iwai S, Kumasaka K, Horikoshi A. Survey of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by the Tokyo johoku association of Pseudomonas studies. J Infect Chemother. 2001 Dec; 7(4): 258-262.
22- Rastegar LA, Bahrami HH, Alaghehbandan R. *Pseudomonas* infections in Tohid Burn Center, Iran. Burns. 1998 Nov; 24(7): 637-41.
23- Niitsuma K, Saitoh M, Kojimabara M, Kashiwabara N. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Fukashima pre fecture. Jpn J Antibiot. 2001 Feb; 54(2): 79-87.
24- Bouza E, Garcia-Garrote F, Cercendo E, Marin M, *Pseudomonas aeruginosa*: survey resistance in 136 hospital in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Apr; 43(4): 981-2.
25- Cavallo JD, Fabre R, Leblan C, Nicolas-Chanonine MH. Antibiotic susceptibility and mechanisms of betalactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2000 Jul; 46(1): 133-136.
26- Shakibaie M, Shahcheraghi F, Hashemi A, Saeed Adeli N. Detection of TEM, SHV and PER Type extended-spectrum β-lactamas gene among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Burnt Patients at Shafa-Haspital, Kerman, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2008 Summer; 11(2): 104-11. (Fulltext in Persian)
27- Mirsalehian A, Feisabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jabal ameli F, Goli H. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Tehran University Medical Journal. 2008; 66: 333-337. (Fulltext in Persian)

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

28- Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H. The survey of genes encoding beta-lactamases, in *Esherichia coli* resistant to beta-lactam antibiotics. IJBMS. 2009 Winter; 13(1): 230-237. (Fulltext in Persian)
29- Matar GM, Al Khodor S, El-Zaatari M, Uwaydah M. Prevalence of the genes encoding extended-spectrum beta-lactamases, in *Escherichia coli* resistant to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics. Ann Trop Med Parasitol. 2005 Jul; 99(4): 413-7.
30- Tashi H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM and SHV-derived extended spectrum beta-lactamases in hospital based Enterobacteriaceae in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2005 Jun; 58(3): 162-167.
31- Jain A, Monal R. TEM & SHV genes in extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella* species & their antimicrobial resistance pattern. Indian J Med Res. 2008 Dec; 128(6): 759- 764.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods

Imani Foolad AA[1], Ph.D; Rostami Z[2], MSc; Shapouri R[3], Ph.D

1- Assistant Prof. of Medical Microbiology, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: imanifouladi.a@gmail.com
2- MSc in Microbiology, Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Islamic of Azad University, Zanjan, Iran. E-mail: faranak_612001@yahoo.com
3- Assistant Prof. of Medical Microbiology, Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Islamic of Azad University, Zanjan, Iran

ABSTRAC

Background and Objectives: Detection of TEM and SHV genes in ESBL producing *Pseudomonas aeruginosa* and their antimicrobial resistance pattern can provide useful information about the epidemiology and risk factors of associated infections. In this study we determined the antimicrobial susceptibility pattern and prevalence of ESBLs in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by phenotypic and genotypic methods.

Methods: In this analytic-descriptive study, 110 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens were used. The pattern of antimicrobial resistance was determined by disk diffusion (Kirby-buer) method. The ESBL production was determined by combination disk method using disks containing ceftazidim and cefotaxim alone and in combination with Clavulanic acid. SHV and TEM types of ESBL producing genes was detected by PCR.

Results: In this study Co-trimoxazole and Amoxicilin with 96.4% and 92.7% and Amikacin with 17.3% showed the highest and lowest resistance against isolates respectively. According to PCR results 37.5% and 12.5% of isolate were carried SHV and TEM genes respectively and 12.5% of isolate were carried both the SHV and TEM genes.

Conclusion: According to the results most of the isolates are drug resistant and among the ESBL producing strains the frequency of SHV type is higher than TEM. The isolate ceftazidim resistance was contains SHV (37.5%) and TEM gene (12.5%), that showed SHV and TEM genes play more important role in create of ceftazidim resistance than cefotaxim resistance.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa;* Antibiotic resistance; ESBL; SHV; TEM

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]