

شناسایی ژن‌های بتالاکتامازها در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا جداشده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR

احسان استبرقی^۱، مجید صادق‌پور^۲، سیما ستوده^۳، کیومرث امینی^۴*

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۶/۰۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب مهم بیمارستانی بوده که به دلیل داشتن مقاومت ذاتی و اکتسابی به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد قابل‌رؤیت در روش‌های تشخیصی بالینی برای ارزیابی باکتری فوق می‌باشد. هدف از این مطالعه جداسازی ژن‌های بتالاکتاماز ESBL از باکتری سودوموناس آئروژینوزا جداشده از نمونه‌های بالینی با استفاده از روش multiplex PCR است.

مواد و روش کار: در مجموع جدایه انسانی از عفونت‌های مختلف که جمع‌آوری شده، پس از جداسازی باکتری و استخراج DNA ژن‌های *vim*، *gim-1*، *sim-1* و *imp* با روش multiplex PCR مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: از ۷۰ جدایه نمونه‌های انسانی از عفونت‌های مختلف و از تمامی گروه‌های سنی جمع‌آوری شده، ژن‌های *sim-1*، *vim*، *gim-1*، *imp* جهت شناسایی مقاومت دارویی در سودوموناس آئروژینوزا از مجموع نمونه بالینی مورد مطالعه تعداد ۶۱ نمونه (۸۷/۱۴ درصد) از کل سویه‌ها مثبت بودند و ژن‌های *VIM*، *sim-1*، *gim-1* در نمونه‌ها مشاهده گردید. ژن‌های *vim*، *gim-1*، *sim-1* در ترتیب درصدی ۲۱/۴۲ و ۲۷/۲۸ و ۲۴/۹۲ را دارا هستند. در این بین دو ژن *imp* و *spm* در نمونه‌ها مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: متالوبتالاکتامازها به دلیل ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده علیه عفونت‌های سودوموناسی بسیار حائز اهمیت بوده و بررسی و تشخیص سریع این آنزیم‌ها در باکتری‌های مقاوم به کاربندیمها از لحاظ اپیدمیولوژیک و همچنین به منظور انتخاب آنتی‌بیوتیک مؤثر و جلوگیری از انتشار چنین عفونت‌هایی در بیمارستان‌ها لازم و بالارزش است. از میان ژن‌های مورد بررسی تنها دو ژن *imp*، *spm-1* مشاهده نشد در حالی که سایر ژن‌های مقاومت در جدایه‌ها به خوبی قابل‌رؤیت بودند.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف ESBL، multiplex PCR

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره هفتم، ص ۵۶۴-۵۵۶، مهر ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران. تلفن همراه: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴

Email: dr_kumarss_amin@yahoo.com

مقدمه

منتهی به مرگ در مبتلایان به فیبروز سیستیک و بیماران نئوپلاسمی و سوختگی‌های شدید است (۱). باکتری‌های بیماری‌زا مانند سودوموناس آئروژینوزا به علت اکتساب ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز برای جامعه بشری خطرناک هستند. این مقاومت به علت ژن‌های بتالاکتاماز با طیف بسیار وسیع (β -Extended Spectrum)

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی، متحرک و میله‌ای از خانواده سودوموناسه است که به‌طور وسیعی در طبیعت انتشار دارد. این باکتری عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی مثل عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت‌های بافت‌های نرم، باکتری (وجود باکتری در خون) عفونت‌های استخوان و مفاصل، عفونت‌های معدی رودهای و عامل

^۱ دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهربابک، شهربابک، ایران

^۲ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

^۳ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

^۴ دانشیار، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (نویسنده مسئول)

انتظار نیست. شناسایی سریع و ردیابی سویه‌های مولد متالوبتالاکتامازها ضروری به نظر می‌رسد و می‌تواند گامی مهم و ضروری در درمان و کنترل عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها به شمار می‌رود. هدف از مطالعه حاضر غربالگری سودوموناس *آئروژینوزا*های جدا شده از بیماران جهت شناسایی ژن‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف و تعیین آن در نمونه‌های (ESBLs) مثبت با کمک Multiplex PCR می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع آوری و انتقال نمونه: جدا یه های متعدد انسانی از نمونه‌های خلط، ادرار، ترشحات زخم سوختگی و کاتتر ادراری در گروه‌های سنی مختلف مبتلا به عفونت‌های تنفسی، عفونت ادراری، سوختگی در مراکز درمانی و بیمارستانی تهران (در فاصله زمانی پاییز تا زمستان ۱۳۹۳) با رعایت اصول نمونه‌برداری تهیه و جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها جهت جداسازی باکتری‌های گرم منفی تولیدکننده ESBLs و باکتری‌های گرم منفی باسیلی به‌ویژه سودوموناس *آئروژینوزا*ی تولیدکننده MBL مورد بررسی و پردازش قرار گرفتند. در نهایت ۷۰ مورد ایزوله جداسازی و آماده انجام مراحل بعدی شد.

خصوصیات باکتری: تعیین هویت با رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی شامل: تست کاتالاز و اکسیداز، تست سیمون سترات، تولید H₂S، تولید ایندول و تحرک، احیای نیترات، اوره آز، تربیل شوگر آبیرون آگار، دکربوکسیلاسیون اورنیتین ولبرین، DNase و تست اکسیداتیو فرمنتاتیو انجام گرفت (۷).

انتخاب آغازگرها (پرایمرها): طراحی دقیق پرایمر برای به دست آوردن محصولات مورد نظر در مقادیر مطلوب و جلوگیری از تکثیر توالی‌های غیراختصاصی ضروری است. معمولاً ۱-۱۰/۱ پرایمر در هر واکنش مورد نیاز می‌باشد (جدول انتخاب پرایمر ۱). ترادف آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است. آغازگرها طبق دستور شرکت سازنده با غلظت ۱۰۰ pm/μl در آب مقطر حل شدند و با غلظت ۱۰ pm/μl در واکنش PCR در حجم ۲۵ μl مورد استفاده قرار گرفتند.

از فن مولکولی Multiplex PCR برای ژن‌های *imp*، *sim-1*، *vim*، *Spm-1*، *gim-1* جهت شناسایی مقاومت چندگانه دارویی در سودوموناس *آئروژینوزا* با توجه به بررسی‌های انجام‌شده و مقایسه توالی‌های مختلف استفاده شد (۸، ۶). استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط کیت انجام شد.

ESBL (Lactamase) است که توسط ترانسپوزون‌ها و پلاسمیدها و یا موتاسیون در باکتری سودوموناس ایجاد می‌شود. بتالاکتامازهای کلاس B یا متالوبتالاکتامازها (MBL) بر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها و سبب عفونت‌های وسیع الطیف و کاربامپنم‌ها (به‌جز مونوباکتام‌ها) مؤثرند و مشکل عمده بالینی بشمار می‌روند. این آنزیم‌ها به کاتیون‌های دو ظرفیتی مثل فلز روی به عنوان کوفاکتور نیاز دارند. اولین آنزیم متالوبتالاکتاماز شناسایی شده IMP-1 در سریشیا مارسسنس در سال ۱۹۹۱ بود. در طی دهه‌های اخیر انواع MBL‌ها از جمله *GIM*، *SPM*، *VIM* نیز شناسایی شده‌اند. سودوموناس *آئروژینوزا* مولد MBL اولین بار در ژاپن در سال ۱۹۹۱ گزارش شد و پس‌از آن در آسیا و اروپا و استرالیا و آمریکا مشاهده شد. سومین عضو این گروه یعنی *SPM-1* در برزیل در سال ۱۹۹۷ و عضو دیگر این گروه تحت عنوان آنزیم *GIM* در سال ۲۰۰۲ از یک نمونه کلینیکی در آلمان جداسازی شد. متالوبتالاکتامازها توسط کلاولونیک اسید و سولباکتام و تازوباکتام که بازدارنده‌های آن هستند مهار نمی‌شوند. بازدارنده‌های آن‌ها در محیط آزمایشگاه شامل اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید، سدیم مرکاپتواستیک اسید و دی‌پیکولینیک اسید و غیره هستند (۴-۲).

باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به‌واسطه هیدرولیز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و آزترونام، معضلات عدیده‌ای را در درمان عفونت‌های خطرناک ناشی از این باکتری‌ها به وجود آورده‌اند. پدیده مقاومت‌های میکروبی چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها (Multidrug Resistance) بین ایزوله‌های ایجادکننده بتالاکتاماز با طیف بسیار وسیع الطیف در بسیاری از کشورها گزارش شده است (۵). چند روش فنوتیپی مبتنی بر مهار MBL توسط ترکیبات تیول و یا EDTA بر روی باکتری‌ها یافت شده است. اگرچه این روش‌ها ساده و ارزان‌تر هستند که بسته به عملکرد آن‌ها متفاوت است. بتالاکتام‌ها یا مهارکننده‌های MBL (IMBL) در جنس باکتری‌های مورد آزمایش قرار دارد که علاوه بر این مهارکننده‌ها در ژن‌های *gim-1*، *spm-1* دیده شد و نیز در پاتوژن‌های تولیدکننده SIM نیز به‌ندرت وجود دارد که توسط این مطالعات قابل ارزیابی است (۶).

علت انتخاب این‌گونه تحقیقات آن است که افزایش میزان ایزوله‌های سودوموناس *آئروژینوزا*ی تولیدکننده ESBLs در کشور و افزایش مصرف کاربامپنم‌ها در درمان عفونت‌های حاصل از آن‌ها و افزایش سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا*ی تولیدکننده متالوبتالاکتامازها و مقاومت‌های چندگانه در بیمارستان‌ها دور از

جدول (۱): پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق برای شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع. (۶)

پرایمر	توالی پرایمر (5' to 3')	ژن هدف	اندازه باند (bp)
IMP	5-GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC-3 5-CCAAACYACTASGTTATCT-3	Imp	(bp ۱۸۸)
VIM	5-GATGGTGTGGTTCGCATA-3 5-CGAATGCGCAGCACCAG-3	Vim	(bp ۳۹۰)
SPM-1	5-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3 5-ACATTATCCGCTGGAACAGG-3	Spm-1	(bp ۲۷۱)
GIM-1	5-TCGACACACCTGGTCTGAA-3 5-AACTTCCAACCTTGCCATGC-3	Gim-1	(bp ۴۷۷)
SIM-1	5-TACAAGGGATTCCGCATCG-3 5-TAATGGCCTGTCCCATGTG-3	Sim-1	(bp ۵۷۰)

جدول (۲): برنامه زمانی و میزان مخلوط واکنش Multiplex-PCR

Primary denaturation	35 step cycles			Final extention
۹۵ درجه سانتی‌گراد	denaturation	Annealing	Extention	۷۲ درجه سانتی‌گراد
۱۰ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۵۵ درجه سانتی‌گراد	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱۰ دقیقه
-	۳۰ ثانیه	۷۰ ثانیه	۱ دقیقه	-

محلول رنگ اریتروزل و مشاهده مستقیم آن تحت تأثیر تابش نور ماورای بنفش تشخیص داده می‌شود.

یافته‌ها

پس از آماده‌سازی ایزوله‌ها و جمع‌آوری موارد انسانی نظیر: خلط، ادرار، ترشحات زخم از سوختگی از مراکز درمانی و بیمارستانی تهران ذکر شده در توضیحات قبل، موارد به شرح زیر مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول (۳): میزان فراوانی نوع عفونت در بیماران مورد مطالعه

نمونه عفونی	انواع گروه‌بندی	تعداد ایزوله (فراوانی)	درصد فراوانی
نمونه تنفسی (تراکئال، خلط و...)	جدایه	۲۵	۳۵/۷۱
نمونه ادراری	جدایه	۱۱	۱۵/۷۲
نمونه زخم از سوختگی	جدایه	۳۴	۴۸/۵۷
جمع	-	۷۰	۱۰۰

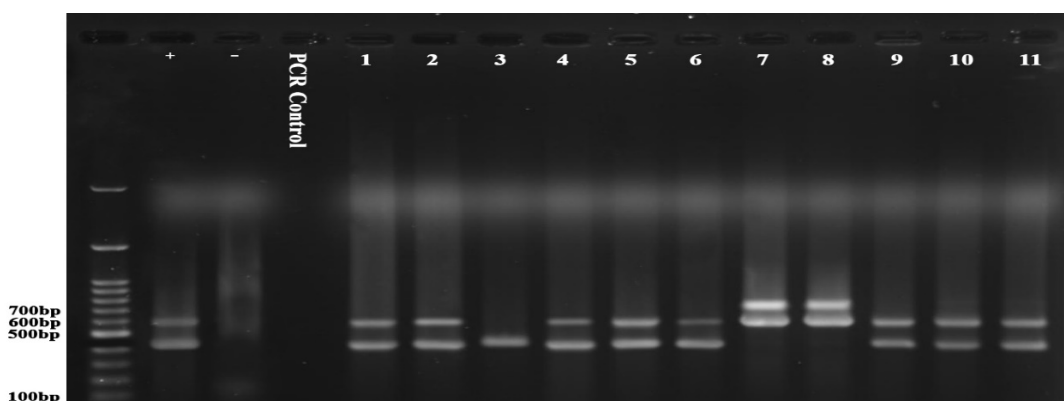
تعداد ۶۱ نمونه (۸۷/۱۴ درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها مثبت بوده و تعداد ۹ نمونه (۱۲/۸۵ درصد) از کل سویه‌ها منفی بودند.

واکنش PCR چند گانه برای هر کدام از جفت پرایمرهای مذکور به صورت جداگانه با مقادیر مشخص از سوپانسیون نمونه در حجم ۲۵ میکرو لیتر صورت گرفت. لازم به ذکر است که تمام واکنش‌های PCR با نمونه کنترل منفی و مثبت (باکتری / شریشیالکی تهیه شده از انستیتو پاستور ایران که دارای ژن‌های مورد بررسی بود) انجام شد. با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، موقعیت و محل نمونه در ژل توسط رنگ‌آمیزی با غلظت‌های پایین

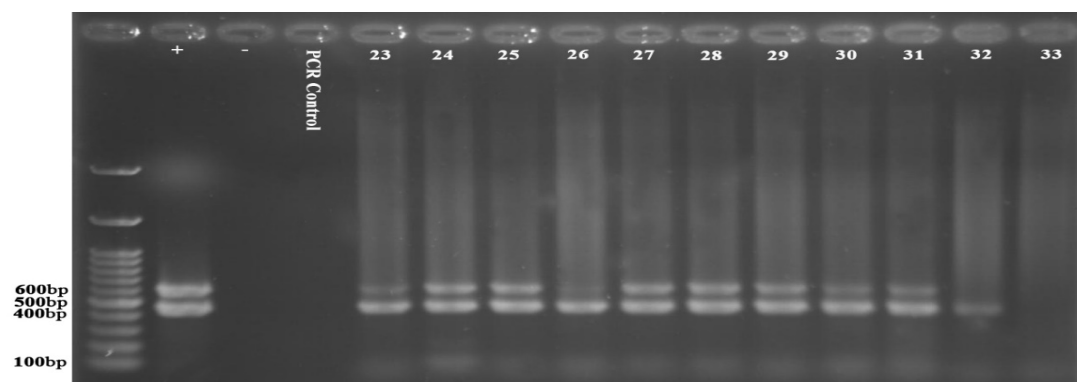
یافته‌های حاصل از واکنش Multiplex PCR جهت ردیابی ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* نمونه‌های انسانی: با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع جدایه‌های نمونه بالینی،

جدول (۴): نتایج حاصل از Multiplex-PCR ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

ردیف	ژن (جفت باز)	تعداد جدایه (%)
۱	VIM (390bp)	۱۵ (۲۱/۴۲)
۲	GIM-1 (477bp)	۱۹ (۲۷/۱۴)
۳	SIM-1 (570bp)	۱۷ (۲۴/۲۸)
۴	IMP (188bp)	(۰)۰
۵	SPM-1 (271bp)	(۰)۰
۶	VIM همراه SIM-1	۹ (۱۲/۸۵)
۷	GIM-1 همراه SIM-1	۱۰ (۱۴/۲۸)



شکل (۱): بررسی وجود ژن‌های مذکور در باکتری سودوموناس آئروژینوزا به روش Multiplex PCR با استفاده از ۵ جفت پرایمر: VIM، SIM-1، GIM-1، IMP، SPM-1 از سمت چپ به ترتیب ستون مارکر ۱۰۰bp، ستون کنترل مثبت، ستون کنترل منفی و ستون ۱-۱۱ سویه-های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با دو باند مربوط به دو پرایمر VIM (۳۹۰) و SIM-1 (۵۷۰)



شکل (۲): بررسی وجود ژن‌های مذکور در باکتری سودوموناس آئروژینوزا به روش Multiplex PCR با استفاده از ۵ جفت پرایمر: VIM، SIM-1، GIM-1، IMP، SPM-1 از سمت چپ به ترتیب ستون مارکر ۱۰۰bp، ستون کنترل مثبت، ستون کنترل منفی و ستون ۲۳-۳۳ سویه-های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با دو باند مربوط به دو پرایمر GIM (۴۷۷) و SIM-1 (۵۷۰)

بحث و نتیجه گیری

تلاش‌ها به جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید ۳ فاکتور عمده یعنی شناسایی به‌موقع ایزوله‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز

یکی از مسائل مهم در درمان بیماری‌های عفونی مقاومت باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. در تمامی

در انگلستان مطالعه‌ای انجام داده و گزارش دادند که از مجموع ۱۳۳۸ ایزوله ۴۹ ایزوله حدود ۳/۷ درصد از نمونه‌ها تولیدکننده ESBLs هستند که از این میان ۳۲ ایزوله (۸۰ درصد) حاوی ژن *veb* می‌باشند (۱۴). در حالی که با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش، تعداد ۶۱ نمونه (۸۷/۱۴ درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها از نظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه (۱۲/۸۵ درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

Lim و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای که در رابطه با سودوموناس آئروژینوزا جداسده در مالزی انجام شد، مشاهده کردند که اکثر ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی از جمله تتراسایکلین (۷۳ درصد) و کلرامفنیکل (۶۰ درصد) به میزان بالا و به میزان کمتر به سفوتاکسیم (۴۰ درصد)، سفتریاکسون (۳۱ درصد)، پیراسیلین (۲۳ درصد) آزرئونام مقاوم هستند. همچنین ۳۳ ایزوله از ۴۸ ایزوله (۶۹ درصد) مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی نشان داده که این به منزله تولید ESBLs توسط این سویه‌ها می‌باشد (۱۵).

Das Neves و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود نشان دادند که بین مصرف داروهای ضد سودومونایی (آمی‌کاسین، سیپروفلوکسولون، سفنازیدیم و ایمپنم) و بروز سودوموناس آئروژینوزای MDR رابطه وجود دارد و میزان شیوع سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBLs در این مطالعه، ۹/۲ درصد تعیین شد (۱۶). با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش حاضر، تعداد ۶۱ نمونه (۸۷/۱۴ درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها از نظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه (۱۲/۸۵ درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

Leinberger و همکاران (۲۰۱۰) به دنبال بررسی فراوانی ژنتیکی و فنوتیپی ESBLs ژن‌های CTX-M و OXA-10 و PER-1 به روش PCR در باکتری‌های سودوموناس جداسازی شده از بیمارستان‌ها دریافتند که فراوانی OXA نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی بیشتر است (۱۷).

Saha و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای که در رابطه با گونه‌های سودوموناس تولیدکننده متابتالاکتاماز بود نشان دادند که ۵۴ درصد از سویه‌های جداسده از عفونت‌های ادراری بیمارستان، مولد ESBLs بوده و ۳۵/۶ درصد سویه‌ها مقاوم به ایمپنم و ۶۱ درصد سویه‌ها بر اساس تست انتشار در آگار تولیدکننده MBL بودند (۱۸).

Peshattiwari و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی تحت عنوان ESBLs و MBL واسط مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا، تهدیدی در حال ظهور به درمان بالینی مشاهده کردند که از ۱۲۶ نمونه سودوموناس، ۲۸ سویه (۲۲/۲ درصد) تولیدکننده ESBLs و

و سیع الطیف، اتخاذ تدابیر درمانی مناسب یعنی عدم استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک و سهولت گسترش ژن مقاومت را در نظر گرفت. متالوبتالاکتامازها به دلیل ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه عفونت‌های سودوموناسی بسیار حائز اهمیت هستند. بررسی و تشخیص سریع این آنزیم‌ها در باکتری‌های مقاوم به کار با اینم‌ها از لحاظ اپیدمیولوژیکی و هم به منظور کمک به پزشکان معالج در انتخاب آنتی‌بیوتیک مؤثر و نیز برای کنترل سویه‌های مقاوم به داروها و جلوگیری از انتشار چنین عفونت‌هایی در بیمارستان‌ها لازم و بارز است. تاکنون روش‌های مختلفی برای شناسایی سویه‌های مولد آنزیم‌های MBL بکار رفته است.

مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا از طریق مکانیسم‌های متعددی که شامل تولید بتالاکتامازها، پمپ‌های ترشحی و تغییرات غشای خارجی می‌باشد. از طرفی ژن‌های ESBLs با ایجاد مقاومت‌های چندگانه به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط دارند به طوری که بروز و انتشار به علت افزایش مقاومت ESBLs ژن‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی، خصوصاً به صورت چند دارویی، مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از آنها ایجاد کرده است (۱۲-۱۰). با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش، تعداد ۶۱ نمونه (۸۷/۱۴ درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها از نظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه (۱۲/۸۵ درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

Varaiya و همکاران (۲۰۰۸) به دنبال پیدایش متالوبتالاکتاماز تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا در بیماران ICU مشاهده کردند که از ۲۴۰ سودوموناس آئروژینوزا جداسده، ۶۰ سویه (۲۵ درصد) مقاوم به کارباپنم و ۵۰ سویه (۲۰/۸ درصد) تولیدکننده MBL بودند. همچنین از ۵۰ سویه تولیدکننده MBL، ۳۸ سویه (۷۶ درصد) از بیماران دیابتی و ۱۲ سویه (۲۴ درصد) از بیماران مبتلا به سرطان بودند. به طور کلی ۳۶ درصد از بیماران گاتی فلوکساسین و ۴۲ درصد به پیراسیلین/تازباکتام پاسخ دادند در حالی که ۱۴ درصد به ترکیبی از گاتی فلوکساسین و پیراسیلین/تازباکتام پاسخ دادند. با توجه به این عامل بیماری‌زای بیمارستانی، متوسط مدت بستری ۳۲ روز که با مرگومیر ۲۰ درصد به دلیل سپتی‌سمی همراه بود (۱۳). در حالی که در پژوهش حاضر با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع جدایه‌های موجود، تعداد ۶۱ نمونه (۸۷/۱۴ درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها از نظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه (۱۲/۸۵ درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

Wodford و همکاران (۲۰۰۸) در ارتباط با تشخیص سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده بتالاکتاماز و سیع الطیف VEB

جدایه‌های پژوهش، تعداد ۶۱ نمونه (۸۷/۱۴ درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها از نظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه (۱۲/۸۵ درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود. در این مطالعه و مقایسه با سایر مطالعات صورت گرفته از میان ژن‌های مورد بررسی تنها دو ژن IMP، SPM-1 مشاهده نشد در حالی که سایر ژن‌های مقاومت در جدایه‌ها به خوبی قابل رؤیت بودند. در نقاط مختلف دنیا مطالعات زیادی راجع به سودوموناس آئروژینوزا و ژن‌های ESBLs صورت گرفته است حال با کمک روش PCR Multiplex می‌توان در کوتاه‌ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن‌های بیماری‌زا پی برد و با درمان مناسب و به موقع از به وجود آوردن سویه‌های مقاوم و انتقال این ژن‌ها در جمعیت‌های انسانی و دامی جلوگیری به عمل آورد. در این مطالعه به شناسایی مولکولی ژن‌های IMP، SPM-1، SIM-، 1, GIM-1, VIM با استفاده از روش Multiplex PCR پرداخته شد که از بین موارد مورد بررسی تنها دو ژن IMP، SPM-1 مشاهده نشد این در حالی است که نتایج بدست آمده از این تحقیق با روش M-PCR با سایر مطالعات صورت گرفته توسط Afzal Azim متفاوت است و علت این تفاوت‌ها می‌تواند در میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین منطقه جغرافیایی و اختلاف در منشأ آکولوژی سویه‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله اقتباس مستقلی از فعالیت تحقیقی و پژوهشی دوره کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی است. بدین وسیله از آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد و کارشناسان میکروبی شناسی و نیز کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References:

- Şener B, Köseoğlu Ö, Özçelik U, Günalp A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol* 2001;291(5):387-93.
- McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2017: 75-89.

۰ (سویه ۷/۸ درصد) تولیدکننده MBL هستند. هیچ‌کدام از سویه‌ها هم‌زمان تولیدکننده ESBLs و MBL نبودند. تمامی سویه‌های تولیدکننده ESBLs به ایمی‌پنم حساس بودند در حالی که سویه‌های تولیدکننده MBL به آمینوگلیکوزیدها، سیپروفلوکساسین و پمپیراسیلین همراه با تازوباکتیم مقاومت نشان دادند (۱۹). در مقایسه با نتایج به دست آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش، تعداد ۶۱ نمونه (۸۷/۱۴ درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها از نظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه (۱۲/۸۵ درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

توجهی و همکاران (۲۰۱۰-۲۰۱۱) به بررسی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) تولیدشده توسط سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بالینی و نمونه‌های زیست‌محیطی در بیمارستان شهید بهشتی کاشان در طول سال‌های ۲۰۱۱-۲۰۱۰ پرداختند و مشاهده کردند که از بین تمامی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده بیشترین مقاومت برای پمپیراسیلین، ایمی‌پنم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، جنتامیسین، سفنازیدیم، آرتروانام و سیپروفلوکساسین دیده شد. هفت سویه (۹/۲ درصد) ESBLs مثبت بودند. ۲۷ درصد از نمونه‌ها حداقل به سه کلاس از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. ۸ تا از ۱۴ نمونه ترشحات، ۴ تا از ۹ نمونه زخم و ۲ تا از ۳ نمونه خون MDR بودند (۲۰).

Okesola و همکاران (۲۰۱۲) تعداد ۹۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا که از بخش‌های مختلف بیمارستان در نیجریه به دست آمده بودند، را مورد بررسی قرار داد که ۲۲/۲ درصد ایزوله‌ها تولیدکننده ESBLs بودند. تولید ESBLs فقط در ایزوله‌های جدا شده از خلط و ادرار مشاهده شدند. همچنین یافتند که گونه سودوموناس آئروژینوزا ۱۰۰ درصد به ایمی‌پنم، مروپنم و آمیکاسین، ۵۰ درصد به سیپروفلوکساسین و ۳۰ درصد به جنتامیسین حساس هستند (۲۱). در مقایسه با نتایج به دست آمده از مجموع

- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002;8(6):321-31.
- Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):2909-13.
- Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Queenan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson JM, et al. Characterization of the extended-spectrum β-

- lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(9):2382-8.
6. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, et al. Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2008;46(6):2028-37.
 7. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2014.
 8. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006;59(2):321-2.
 9. Köser CU, Holden MT, Ellington MJ, Cartwright EJ, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med* 2012;366(24):2267-75.
 10. Tam VH, Chang K-T, Abdelraouf K, Brioso CG, Ameka M, McCaskey LA, et al. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3):1160-4.
 11. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare. *Clin Infect Dis* 2002;34(5):634-40.
 12. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8(1):71-93.
 13. Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J. Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. *Indian J Med Res* 2008;127(4):398.
 14. Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, Yarde S, Tomas MdM, Faris C, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum β -lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2008;62(6):1265-8.
 15. Lim K-T, Yasin RM, Yeo C-C, Puthuchery S-D, Balan G, Maning N, et al. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect* 2009;42(3):197-209.
 16. Neves MTd, Lorenzo MEPd, Almeida RAMB, Fortaleza CMCB. Antimicrobial use and incidence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital: an ecological approach. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(6): 629-32.
 17. Leinberger DM, Grimm V, Rubtsova M, Weile J, Schröppel K, Wichelhaus TA, et al. Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes. *J Clin Microbiol* 2010;48(2):460-71.
 18. Saha R, Jain S, Kaur IR. Metallo beta-lactamase producing pseudomonas species--a major cause of concern among hospital associated urinary tract infection. *J Indian Med Assoc* 2010;108(6):344-8.
 19. Peshatiwar PD, Peerapur BV. ESBL and MBL mediated resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: An emerging threat to clinical therapeutics. *J Clin Diagn Res* 2011;5:1552-4.
 20. Tavajjohi Z, Moniri R, Khoeshidi A. Frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) multidrug-resistance produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental specimens in Kashan Shahid Beheshti hospital during. 2010-11. *Feyz* 2011; 15(2). (Persian)

21. Okesola AO, Oni AA. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing

Pseudomonas aeruginosa Strains in South-West Nigeria. Res J Med Sci 2012; 6(3): 93-6.

ISOLATION OF ESBL GENES FROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS BY MULTIPLEX PCR METHOD

Ehsan Strabaghi¹, Majid Sadeghpour², Sima Sotoudeh³, kumarss Amini^{4*}

Received: 01 May, 2019; Accepted: 28 Aug, 2019

Abstract

Background & Aims: Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is an important hospital opportunistic pathogen, due to its intrinsic and acquired resistance to several antibiotics found in clinical laboratories for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. The aim of this study was to isolate ESBL beta-lactamase genes from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens using multiplex PCR.

Materials & Methods: In total, human isolates from different infections that were collected after isolation of bacteria and extraction of DNA of *vim*, *gim-1*, *sim-1*, *imp*, *spm-1* genes were studied by multiplex PCR.

Results: Of 70 isolates of human specimens from different infections and of all age groups, *sim-1*, *imp*, *vim*, *-1 spm*, and *gim-1* genes were used to detect drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from the total clinical samples studied, 61 samples (87.14%) were positive from all strains and *VIM*, *gim-1*, and *sim-1* genes were observed in samples. The percentage of *vim*, *gim-1*, and *sim-1* genes in samples were 21.22, 27.28 and 24.92, respectively. In this regard, *imp* and *spm* genes were not observed in the samples.

Conclusion: Metalobetalactamas is very important due to its resistance to a wide range of antibiotics used against *pseudomonas* infections, and the rapid detection of these enzymes in epidemiological and carbapenem resistant bacteria. In summary, Choosing an effective antibiotic and preventing the spread of such infections in hospitals is necessary and valuable.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ESBL, Multiplex PCR

Address: Faculty of Basic Sciences, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Tel: (+98)9125454074

Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2019; 30(7): 564 ISSN: 1027-3727

¹ PhD in Microbiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahre Babak Branch, Shahre Babak, Iran

² M.Sc in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

³ Master of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

⁴ Associate Professor, Faculty of Basic Sciences, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (Corresponding Author)