مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۳/هفته اول شهریور ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۱۴

مطالعه‌ی مولکولی برخی ژن‌های سودوموناس‌های تولیدکننده‌ی ESBL جداشده از بیماران در مراکز درمانی و بیمارستانی

مریم کونانی[۱]، دکتر مجید باصری صالحی[۲]، دکتر نیما بهادر[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا مانند سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به علت ژن‌های ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases) است که توسط ترانسپوزون‌ها و پلاسمیدها و یا موتاسیون در باکتری‌های سودوموناس ایجاد می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی فراوانی ژن‌های OXA-10، PER-1، CTX-M1، CTX-M2 و CTX-M3 در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی‌شده از عفونت‌های کلینیکی و بیمارستانی شهرستان شیراز بود.

روش‌ها: باکتری‌های عامل عفونت از افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های شهرستان شیراز در مدت ۶ ماه جداسازی شد و پس از تعیین هویت و انجام تست آنتی‌بیوگرام، به روش Double disc synergy فنوتیپ ESBLها ارزیابی شد. سپس DNA باکتری استخراج شد و به روش PCR (Polymerase chain reaction) و استفاده از پرایمرهای اختصاصی فراوانی ژن‌ها ارزیابی شد.

یافته‌ها: از ۷۲۸ باکتری جداسازی‌شده، ۶۲ باکتری سودوموناس آئروژینوزا شناسایی گردید که بیشترین مقاومت در این باکتری‌ها مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و ایمی‌پنم بود. بیشترین فراوانی ژنی ESBLهای مورد مطالعه به ترتیب مربوط به ژن OXA -10، PER-1، CTX-M1، CTX-M2 و CTX-M3 بود.

نتیجه‌گیری: همه‌ی ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش بر روی کروموزوم باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا قرار داشتند. بنابراین بررسی بیشتر ژن‌های ESBL مانند ژن OXA که فراوانی بیشتری در سویه‌های سودوموناس دارد ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، ژن OXA، سودوموناس آئروژینوزا، آنتی‌بیوگرام

ارجاع: کونانی مریم، باصری صالحی مجید، بهادر نیما. **مطالعه‌ی مولکولی برخی ژن‌های سودوموناس‌های تولیدکننده‌ی ESBL جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌ها.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۳): ۱۰۱۷-۱۰۰۷

مقدمه

امروزه با استفاده‌ی بی رویه از آنتی‌بیوتیک در کشور ما باکتری‌ها مکانیسم‌های مقاومت را دریافت کرده‌اند و نسبت به داروها مقاومت نشان می‌دهند. این مکانیسم می‌تواند به صورت دریافت ژن‌های مقاومت از طریق پلاسمید، ترانسپوزون و یا موتاسیون باشد. یکی از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌هایی که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرد، آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام می‌باشند که از مصرف بالایی در کشور برخوردار می‌باشند و به علت همین مصرف بی رویه و

۱- کارشناس ارشد، میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران
۲- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران
۳- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مریم کونانی
Email: konani_maryam@yahoo.com

خودسرانه‌ی این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌های عامل عفونت در بیمارستان‌ها شده است. در اواسط دهه‌ی ۱۹۸۰ گروه جدیدی از آنزیم‌ها به نام بتالاکتامازهای با طیف وسیع معرفی شدند که قادر به تخریب سفالسپورین‌های با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم بودند که آن‌ها را ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases) نام نهادند.

ESBLها شامل تعدادی آنزیم‌های موتاسیون‌یافته هستند که اجازه‌ی هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع‌الطیف را می‌دهند. برای اولین بار این آنزیم‌ها در سال ۱۹۸۳ در کشور آلمان از باکتری کلبسیلا پنومونیه و متعاقب آن از باکتری سودوموناس آئروژینوزا جداسازی گردید (۲-۱). ESBLها در تقسیم‌بندی که توسط Bush و همکاران صورت گرفت، به چهار گروه اصلی A تا D طبقه‌بندی شدند (۳).

ESBL گروه A: پلاسمیدهای مربوط به بتالاکتاماز هستند که فقط در باسیل‌های گرم منفی شرح داده شده‌اند و سبب هیدرولیز پنی‌سیلین، سفالسپورین‌هایی با طیف کم و وسیع می‌شوند. بیشتر سویه‌های تولیدکننده‌ی ESBL دارای موتانت‌های TEM-1، TEM-2 و SHv-1 از باکتری‌های اشرشیا کلی،کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشند (۴-۳).

ESBL گروه B: شامل متاپروتئازهایی هستند که قادر به هیدرولیز کرباپنم‌ها هستند و در باکتری‌های سراشیا مارسنس و سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده‌اند (۴-۳).

ESBL گروه C: این گروه کروموزومی هستند و با فرکانس مقاومت بالا در میان انتروباکتر گزارش شده است (۵، ۳).

ESBL گروه D: بتالاکتامازهای با قدرت هیدرولیز زیاد بر علیه اکساسیلین و کلوکساسیلین هستند. اسید کلاوولانیک به طور ضعیف از فعالیت آن‌ها جلوگیری می‌کند (۵، ۳).

یکی از مهم‌ترین باکتری‌های عامل عفونت بیمارستانی گونه‌های سودوموناس می‌باشد که در این بین سودوموناس آئروژینوزا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. این باکتری می‌تواند عفونت‌های پس از سوختگی، ادرار، زخم، خون، عفونت چشم و عفونت گوش را ایجاد کند و بعد از استافیلوکوکوس اورئوس مهم‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. باکتری سودوموناس به دلیل دارا بودن مکانیسم‌های متعدد از جمله داشتن ژن‌های ESBL به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم می‌باشد. کلاس A و D دارای ژن‌های بسیار مهمی در ایجاد بیماری هستند و فراوانی آن‌ها بر طبق سایر مطالعات در باکتری سودوموناس به اثبات رسیده است. ژن OXA متعلق به کلاس A و ژن PER از گروه D می‌باشد. در پژوهش حاضر به مدت ۶ ماه باکتری سودوموناس آئروژینوزا از برخی بیمارستان‌های شهرستان شیراز جداسازی شد و سپس ژن‌های ESBL کلاس A و D به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی، مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها

به منظور جمع آوری نمونه طی ۶ ماه (۳ بار مراجعه در هر هفته) از افراد مراجعه کننده به مراکز درمانی، بیمارستان ها، نمونه های بالینی به صورت تصادفی انتخاب شدند. سپس با گرفتن رضایت‌نامه از بیماران و تکمیل فرم مشخصات فردی و بالینی آن‌ها،

نمونه‌گیری انجام شد. بر اساس نظر کمیته‌ی تعهد اخلاقی نسبت به مخفی بودن نام و مشخصات هر یک از افراد مورد آزمایش، نمونه‌ها به آزمایشگاه تخصصی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس منتقل شد و اقدام به جداسازی و تعیین هویت باکتری‌های عامل عفونت گردید.

تعیین هویت با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، تعیین شکل میکروسکوپی میکروارگانیسم، تست‌های کاتالاز و اکسیداز و سایر تست‌های بیوشیمیایی شامل تست سیمون سیترات، تولید H2S، تولید ایندول و تحرک، احیای نیترات، اوره‌آز، تریپل شوگر آیرون آگار، دکربوکسیلاسیون اورنیتین و لیزین، DNase و تست اکسیداتیو فرمنتاتیو، انجام گرفت. نتایج بر اساس کتاب Bergey بررسی و ثبت گردید (۶).

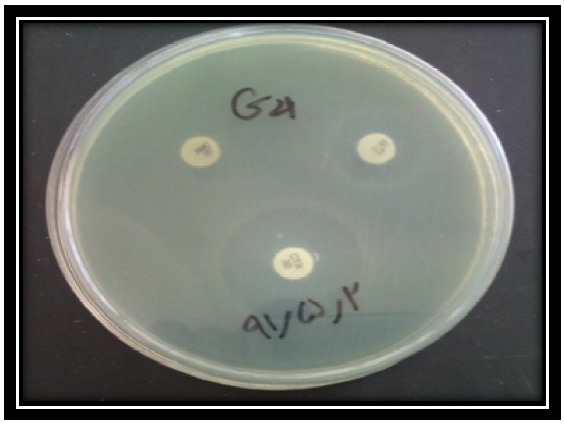
سپس باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزای تعیین هویت‌شده جهت تشخیص سوش‌های تولیدکنندی ESBL بررسی قرار شدند.

تست آنتی‌بیوگرام و Double disc synergy

برای انجام تست آنتی‌بیوگرام، از روش Kirby bauer استفاده شد. از طریق استاندارد NCCLS (National committee for clinical laboratory standards) و تهیه‌ی غلظت نیم مک‌فارلند از باکتری و کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم، نالیدیکسیک اسید، تری‌متوپریم- سولفامتاکسازول، سفتریاکسون، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، آمیکاسین، سفوتاکسیم، سفوتتان، آموکسی‌سیلین/ کلاولانیک اسید، اریترومایسن، آمپی‌سیلین در سطح پلیت با رعایت استاندارد، تست آنتی‌بیوگرام انجام گردید. سپس با استفاده از روش Disc diffusion و Double disc synergy و استفاده از دیسک‌های سفوتتان، سفوتاکسیم به تنهایی و با آموکسی‌سیلین/ کلاولانیک اسید و غلظت نیم مک‌فارلند از باکتری، تعیین هویت فنوتیپی ESBL انجام شد (شکل ۱).

تعیین هویت مولکولی ژن‌های ESBL در سوش‌های تولیدکننده‌ی آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف

در ادامه باکتری‌هایی که فنوتیپ ESBL آن‌ها مثبت گزارش شد، در محیط مایع Luria bertani به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت شبانه داده شدند و سپس استخراج DNA از باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از کیت DNP شرکت سیناکولن (ایران) انجام شد. پس از آن بر روی ژن‌های OXA-10، PER-1، CTX-M1، CTX-M2 و CTX-M3 بر اساس جدول ۱ به کمک پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی، PCR (Polymerase chain reaction) انجام شد.



شکل ۱. تعیین فنوتیپی ESBL به روش Double disc synergy

برای ژن‌های OXA-10، PER-1 به صورت جداگانه PCR انجام گرفت و ژن‌های CTX-M1،

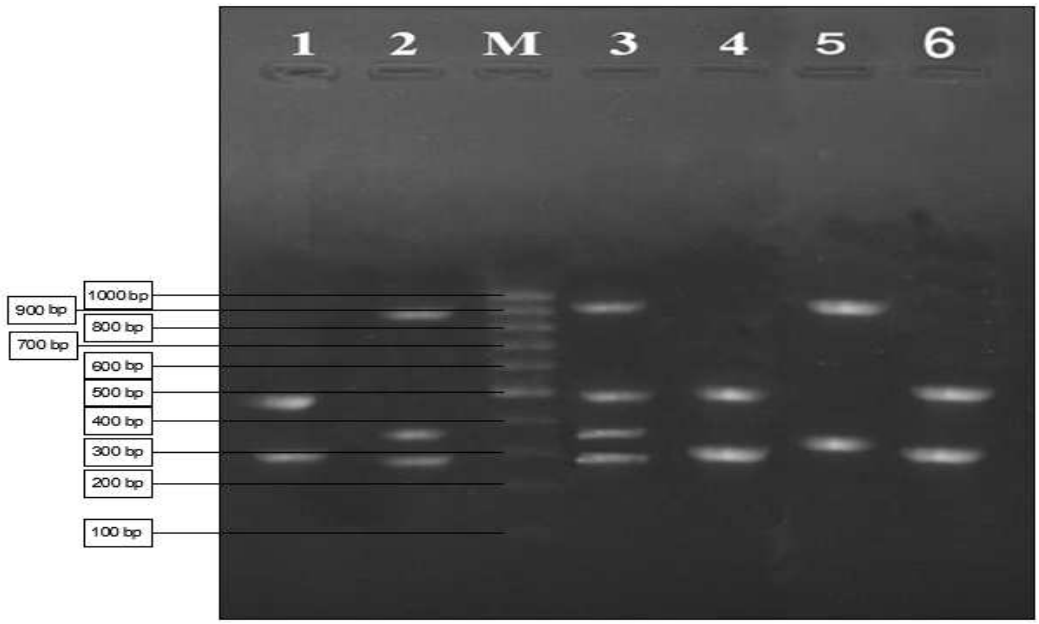
CTX-M2 و CTX-M3 با روش مولتی‌پلکس PCR، ارزیابی شدند (شکل ۲).

تنظیم دستگاه ترمال سایکلر برای انجام PCR بر اساس منابع ذکرشده در جداول ۲ تا ۴ به طور دقیق آورده شده است (۹-۷).

نتایج حاصل از پژوهش با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۱/۵ (version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL) و توسط آزمون‌های χ^2، Fisher's exact و ANOVA تجزیه و تحلیل گردید. سپس درصد فراوانی‌ها بر اساس آزمون میانگین Duncan محاسبه شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر

نام ژن	طول ژن (جفت باز)	دمای ذوب پرایمر	توالی پرایمر '۳ - '۵	منبع
OXA	۲۷۷	۵۴	F-TCAACAAATCGCCAGAGAAG R-TCCCACACCAGAAAAACCA	۷
PER	۹۲۵	۵۲	F-AATTTGGGCTTAGGGCAGAA R-ATGAATGTCATTATAAAAGC	۶
CTX-M1	۴۹۹	۵۰	F-GACGATGTCATCGGCTGAGC R-AGCCGCCGACGCTAATACA	۸
CTX-M2	۳۵۱	۵۰	F-GCGACCAGGTTAACTACAATCC R-CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC	۸
CTX-M3	۳۰۷	۵۰	F-CGCTTTGCCATGTGCAGCACC R-GCTCAGTACGATCGAGCC	۸



شکل ۲. ژل الکتروفورز ۱/۵درصد آگارز

۱: OXA-10 ۲۷۷ جفت باز و CTX-M1 ۴۹۹ جفت باز ۲: OXA-10 و CTX-M2 ۳۵۱ جفت باز

M: مارکر ۱۰۰ جفت باز

۳: - CTX-M3 ۳۰۷ جفت باز، M2CTX ۳۵۱ جفت باز، CTX-M1 ۴۹۹ جفت باز و PER ۹۲۵ جفت باز

۴: CTX-M3 ۳۰۷ جفت باز و CTX-M1 ۴۹۹ جفت باز ۵: CTX-M2 ۳۵۱ جفت باز و PER ۹۲۵ جفت باز

۶: CTX-M3 ۳۰۷ جفت باز و CTX-M1 ۴۹۹ جفت باز

جدول ۲. مراحل و سیکل حرارتی ژن OXA-10

مراحل	دما (درجه‌ی سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
مرحله‌ی اولیه‌ی دناتوره شدن	۹۴	۱۸۰
دناتوره شدن	۹۴	۶۰
آنالینگ	۵۹	۳۰
طویل شدن	۷۲	۶۰
طویل شدن انتهایی	۷۲	۶۰۰

جدول ۳ مراحل و سیکل حرارتی ژن PER-1

مراحل	دما (درجه‌ی سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
مرحله‌ی اولیه‌ی دناتوره شدن	۹۴	۱۸۰
دناتوره شدن	۹۴	۶۰
آنالینگ	۵۷	۳۰
طویل شدن	۷۲	۶۰
طویل شدن انتهایی	۷۲	۶۰۰

جدول ۴. مراحل و سیکل حرارتی ژن‌های CTX-M1، CTX-M2 و CTX-M3

مراحل	دما (درجه‌ی سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
مرحله‌ی اولیه‌ی دناتوره شدن	۹۴	۱۸۰
دناتوره شدن	۹۴	۶۰
آنالینگ	۵۵	۳۰
طویل شدن	۷۲	۶۰
طویل شدن انتهایی	۷۲	۶۰۰

یافته‌ها

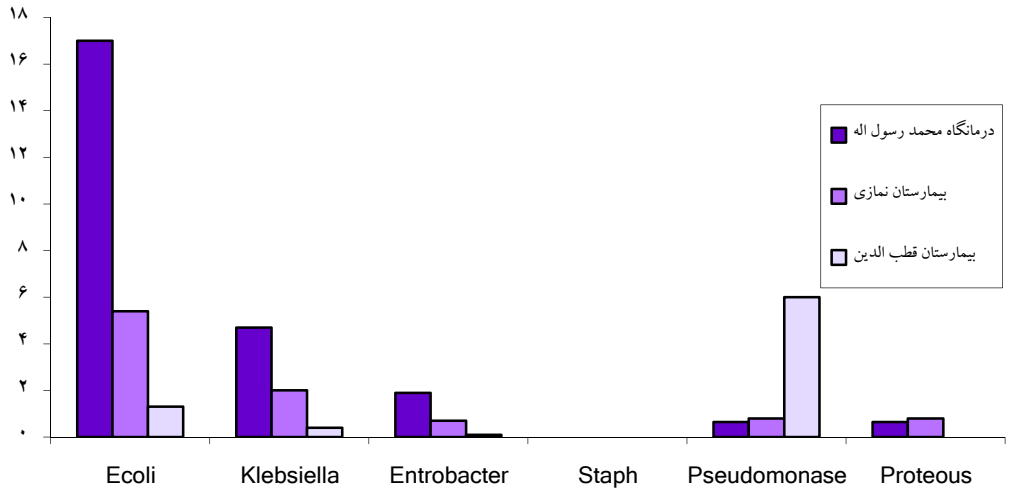
در این پژوهش ۷۲۸ نمونه‌ی مثبت از بیمارستان‌ها و مراکز درمانی شهرستان شیراز جمع‌آوری گردید. بیشترین باکتری جداسازی‌شده اشرشیا کلی با فراوانی ۳۸ درصد و کمترین تعداد باکتری، استافیلوکوکوس به فراوانی ۱ درصد بود. بیشترین درصد فراوانی باکتری سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان فطب‌الدین شیرازی جداسازی گردید (شکل ۳).

در پژوهش حاضر بیشترین و کمترین فراوانی عفونت به ترتیب در گروه سنی ۳۰-۲۱ سال (۲۸/۸ درصد) و گروه سنی ۶۰-۵۰ سال (۱/۹۲ درصد) دیده شد.

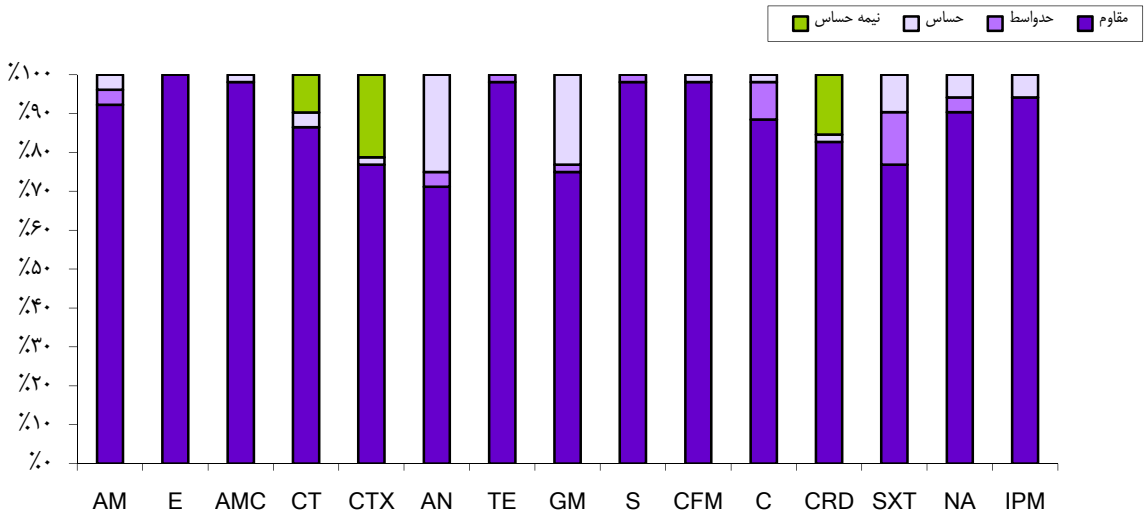
بیشترین فراوانی عفونت‌های بیمارستانی در زنان و به میزان ۵۷/۷ درصد و کمترین در مردان به میزان ۴۲/۳ درصد گزارش گردید. در این میان ۶۲/۸ درصد از مجموع نمونه‌های به دست‌آمده از زنان متعلق به کشت زخم بود، در حالی که در مردان فراوانی ۳۷/۲ درصد گزارش گردید.

بیشترین تعدادباکتری‌های سودوموناس آئروژینوزای جداسازی‌شده از عفونت‌های بیمارستانی

مربوط به عفونت زخم حاصل از سوختگی بـه میـزان ۸۲/۶ درصد و کمترین تعداد باکتری مربوط به تریپـل لومن به میزان ۱/۹۲ درصد بـود. نتـایج آنتـی‌بیـوگرام نشان داد که بیشترین مقاومـت بـاکتری سـودوموناس آئروژینوزا مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین به میـزان ۱۰۰ درصـد و آموکسـی‌سـیلین، تتراسـایکلین، استرپتومایسین به میزان ۹۸/۱ درصد و کمترین میـزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیـک‌هـای جنتامایسـین بـه میـزان ۷۵ درصـد و سفوتاکسـیم، تـری متـوپریم-سولفامتوکسازول به میزان ۷۶/۹ درصد بود (شکل ۴).

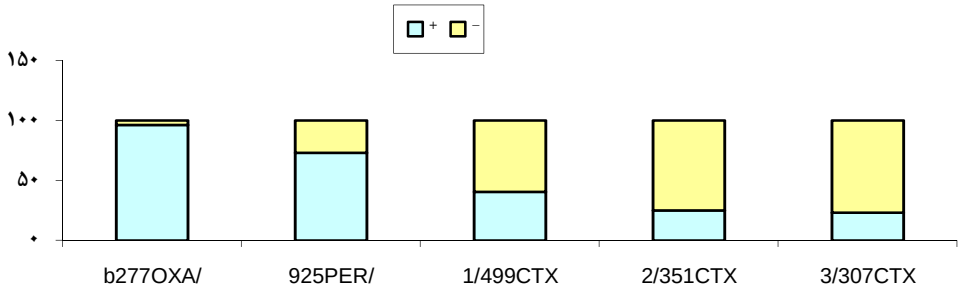


شکل ۳. درصد فراوانی باکتری‌ها در برخی از مراکز درمانی مورد بررسی در تحقیق حاضر



شکل ۴. درصد فراوانی باکتری‌های مقاوم، حد واسط، حساس و نیمه حساس به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

AM-10: Ampicillin- staphylococci; E-15: Erythromycin; AmC-30: Amoxicillin/clavulanic acid- other organisms; CTT-30: Cefotetan; CTX-30: Cefotaxime; AN-30: Amikacin; Te-30: Tetracycline; GM-10: Gentamicin; S-10: Streptomycin; C-30: Chloramphenicol; CRO-30: Ceftriaxone



شکل ۵. درصد فراوانی نمونه‌های مثبت یا منفی هر ژن

بیشترین حساسیت در آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آمیکاسین به ترتیب به میزان ۲۳/۱ درصد و ۲۵ درصد مشاهده شد. به طوری که در ۵۲ سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزا از مجموع ۶۲ سویه سودوموناس جمع‌آوری‌شده مقاومت آنتی‌بیوتیکی دیده شد.

در این پژوهش بیشترین فراوانی ژنی متعلق به ژن OXA-10 به میزان ۹۶/۲ درصد و کمترین فراوانی مربوط به ژن CTX-M3 به میزان ۲۳/۱ درصد بود (شکل ۵).

بحث

متأسفانه مصرف بی رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه‌های اخیر موجب افزایش ظهور سویه‌های مقاوم با مقاومت چندگانه دارویی در باکتری های عفونت زا از جمله سودوموناس آئروژینوزا شده است (۱۱-۱۰).

این باکتری‌ها با تولید ESBLS نسبت به آنتی بیوتیک هایی چون سفالوسپورین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم مقاومت نشان می‌دهند. وجود ژن کدکننده‌ی آنزیم های بتالاکتامازی و انتقال آن در بین باکتری ها تهدید بزرگ برای مصرف کنندگان سفالسپورین های با طیف وسیع به شمار می‌آیند (۱۲). دلیل اصلی انجام این تحقیق تعیین میزان فراوانی برخی ژن‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های شیراز جهت بهینه‌سازی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها توسط پزشکان و جلوگیری از مقاومت به باکتری‌های سودوموناس در عفونت‌های بیمارستانی بود.

با بررسی نتایج می‌توان گفت که باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی‌شده از مراکز درمانی شهرستان شیراز مقاومت های چندگانه به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مانند خانواده‌ی بتالاکتام مداشتند. از دیدگاه تولید آنزیم های بتالاکتامازی توسط باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا که در ایجاد عفونت ها نقش مهمی را ایفا می‌کند و همچنین ژن های عامل مقاومت به آنزیم های بتالاکتاماز در این باکتری، مطالعات گسترده و متعددی گزارش شده است.

Hassanein الگوی مقاومتی سودوموناس را به آنتی بیوتیک‌ها ارزیابی کرد. نتایج مطالعه‌ی وی نشان داد که باکتری سودوموناس جداشده به ترتیب به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین، نورفلوکساسین و کلرامفنیکل مقاومت بیشتری دارند (۱۳).

توجهی و همکاران ژن‌های ESBL را در سودوموناس‌های جداسازی‌شده از بیمارستان‌ها بررسی کردند. آن‌ها مقاومت به ایمی‌پنم را ۶۷/۵ درصد گزارش کردند که با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد و نشان دادند که ۸/۱ درصد از کل باکتری‌های بیمارستانی دارای ژن‌های ESBL می‌باشند (۱۴). Chikwendu و همکاران اثر ۱۳ آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف را بر روی سویه‌های سودوموناس جداسازی‌شده از محیط را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نیز مانند پژوهش حاضر بیشترین مقاومت را در آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین و سفوروکسیم گزارش نمود (۱۵). در بررسی که توسط شاهچراغی و همکاران انجام شد، حضور ژن‌های VEB، OXA-10، CTX-M، PER-1، GES-1، OXA-1 و OXA-4 در سویه‌های سودوموناس جداسازی‌شده از بیمارستان‌های ایران به اثبات رسید (۱۶).

نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر نشان داد که تعداد باکتری‌های سودوموناس جداسازی‌شده نسبت به میزان جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در تحقیقات دیگران محققان مانند Jemima و Verghese که به مدت ۳ سال فنوتیپ و ژنوتیپ ESBLها را در باکتری‌های سودوموناس ارزیابی کردند، بسیار بیشتر بود. آن‌ها در این مدت ۵۰ باکتری سودوموناس حامل ژن‌های ESBL را با روش مولتی‌پلکس PCR شناسایی کردند (۱۷). به نظر می‌رسد مصرف بی رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های خانواده‌ی پنی‌سیلین توسط مردم در کشور ایران باعث کسب روز افزون ژن‌های مقاومتی توسط باکتری‌هایی مانند سودوموناس شده باشد.

ESBLها توسط پلاسمیدها یا ترانسپوزون‌ها منتقل می‌گردند که می‌توانند در ژنوم باکتری القا شوند. ممکن است باکتری ژن ESBL را درون کروموزوم باکتری وجود داشته باشد. در این پژوهش تعیین فنوتیپی انجام‌شده دلیلی بر این نبود که ژن عامل مقاومت این باکتری که به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز مقاوم می‌باشد به طور حتم بر روی کروموزوم قرار دارد، بلکه ممکن است منشأ پلاسمیدی داشته باشد. بنابراین می‌توان گفت عدم وجود بعضی از ژن‌های مورد مطالعه در باکتری‌هایی که از لحاظ فنوتیپی ESBL آن‌ها مثبت گزارش شد، به این معنی نیست که این باکتری‌ها فاقد ژن‌های مقاومت به بتالاکتاماز هستند بلکه این امکان وجود دارد که این ژن‌ها از طریق پلاسمید حمل شوند و یا ژن‌های دیگر را که مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، دارا باشند. در تحقیقی دیگر که توسط Uemura و همکاران انجام شد نیز نشان داده شد که ژن‌های ESBL در سودوموناس می‌تواند توسط ترانسپوزن IS26 منتقل شود، در این جا این نکته تقویت پیدا می‌کند که ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها توسط باکتری‌ها از محیط اطراف کسب می‌شود. آن‌ها ثابت کردند که ژن‌های SHV-12 می‌تواند توسط ترانسپوزون انتقال یابد و در ادامه‌ی تحقیقات خود توانستند پنج ترانسپوزون IS26 را جداسازی کنند (۱۸).

در ادامه‌ی پژوهش حاضر با استفاده از روش های Double disc synergy و روش دیسک ترکیبی، سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی بیوتیک ها، از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز، مثبت شناسایی شدند. بیشترین تعداد سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزای جداسازی شده مربوط به بیمارستان سوانح سوختگی قطب الدین شیرازی به میزان ۸۶/۵٪

درصد از کل نمونه‌های سودوموناس به دست‌آمده، بود. در این میان بیشترین سویه ی سودوموناس از عفونت زخم حاصل از سوختگی به میزان ۸۶ درصد گزارش گردید.

Leinberger و همکاران فراوانی ژنتیکی و فنوتیپی ESBL ژن‌های CTX-M، OXA-10 و PER-1 را به روش PCR در باکتری‌های سودوموناس جداسازی‌شده از بیمارستان‌ها مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نیز مانند پژوهش حاضر نتیجه گرفتند که فراوانی ژن OXA نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی بیشتر بود (۱۹).

علی‌پور و همکاران فراوانی ژن OXA-10 در سودوموناس جداسازی‌شده را ۸۷/۶ درصد گزارش کردند که با تحقیق حاضر مطابقت داشت (۲۰). در آنکارا Danel و همکاران اثبات کردند که ژن‌های PER و OXA باعث تولید آنزیم‌هایی می‌شوند که آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف خانواده‌ی بتالاکتام را می‌شکنند. این محققان نشان دادند که ژن OXA-10 در باکتری سودوموناس می‌تواند با ترانسپوزون‌هایی که ژن مقاومت به فلزات سنگین مانند جیوه و کادمیوم را حمل می‌کند منتقل شود (۲۱).

نتیجه‌گیری

بررسی حاضر نشان داد که اکثر سویه‌های سودوموناس دارای ژن‌های مقاومتی ESBL از کلاس A و D هستند که پیامد این امر برای ژن PER مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده‌ی مونوباکتام، سفم‌ها و سفتازیدیم‌ها و برای ژن OXA مقاومت در برابر خانواده‌ی کربوکسی پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و پاپیراسیلین‌ها می‌باشد. بنابراین بهتر است در روند درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های سودوموناسی از آنتی‌بیوتیک‌های نام‌برده، استفاده نشود.

در پژوهش حاضر فنوتیپ و ژنوتیپ ESBLهای کلاس یک و چهار مد نظر بودند. به دلیل این که کلاس یک ژن‌های بسیار مهمی دارد و فراوانی آن‌ها بر طبق سایر مطالعات در باکتری سودوموناس به اثبات رسیده است، بیشترین ژن‌ها را از کلاس یک انتخاب نمودیم. ژن PER-1 نیز فراوانی بالایی در سویه‌های سودوموناس دارا می‌باشد. در این پژوهش نتایج حاصل دلیلی بر کروموزومی بودن اکثر ژن‌های ESBL بود.

در این پژوهش فقط ژن‌های مقاومت به بتالاکتامازها مورد بررسی قرار گرفت، در حالی که این امکان وجود دارد که باکتری‌های جداسازی‌شده به آنتی‌بیوتیک‌های دیگری که محل عمل آن‌ها جایگاه‌هایی مانند ریبوزوم، غشای سلولی و یا هسته هستند نیز مقاوم باشند. در کشور ما به دلیل استفاده‌ی بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص خانواده‌ی پنی‌سیلین‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی با سرعت بالایی رو به افزایش است و بیماران به دلیل کامل نکردن دوره‌ی درمان خود، باعث گسترش و افزایش روز افزون چنین مقاومت‌هایی شده‌اند؛ در صورتی که در مطالعات دیگر در سایر کشورها با وجود این که چندین سال در سطح وسیع‌تری نمونه‌گیری شده بود، تعداد باکتری‌های مقاوم کمتری جداسازی شدند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از مدیریت محترم آزمایشگاه بیمارستان سوختگی قطب‌الدین شیرازی به دلیل پشتیبانی عمومی در اجرای تحقیق اعلام می‌داریم.

References

1. Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13(Suppl 1): S17-S29.
2. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10(4): 867-78.
3. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(6): 1211-33.
4. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortes P, Gonzalez JJ, Lavilla S, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). J Antimicrob Chemother 2006; 58(1): 211-5.
5. Ahmed I, Salam A. Extended-spectrum beta lactamases and bacterial resistance. Pak J Med Sci 2002; 18(2): 151-5.
6. Holt JG. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1994.
7. Claeys G, Verschraegen G, de Baere T, Vaneechoutte M. PER-1 beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in an intensive care unit. J Antimicrob Chemother 2000; 45(6): 924-5.
8. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother 2002; 50(1): 11-8.
9. Bameri Z, Chitsaz M, Oulia P. Detection of CTX-M-β lactamases in isolated Klebsiella pneumonia. Iranian Journal of Pathology 2010; 5(3): 137-42.
10. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med 2010; 362(19): 1804-13.
11. Bendinelli M, Friedman H, Bergogne-Berezin E. Acinetobacter biology and pathogenesis. New York, NY: Springer; 2008.
12. Subha A, Ananthan S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among Klebsiella pneumoniae in Chennai. Indian J Med Microbiol 2002; 20(2): 92-5.
13. Hassanein WA. Molecular identification of resistant pseudomonas aeruginosa Wt. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2009; 3(3): 2144-53.
14. Tavajjohi Z, Moniri R, Khorshidi A. Detection and characterization of multidrug resistance and extended-spectrum-beta-lactamase-producing (ESBLS) Pseudomonas aeruginosa isolates in teaching hospital. African Journal of Microbiology Research 2011; 5(20): 3223-8.
15. Chikwendu CI, Ibe SN, Okpokwasili GC. Detection of blaSHV and blaTEM beta-lactamase genes in multi-resistant Pseudomonas isolates from environmental sources. African Journal of Microbiology Research 2011; 5(15): 2067-74.
16. Shacheraghi F, Shakibaie MR, Noveiri H. Molecular Identification of ESBL genes blaGES-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. International Journal of Biological and Life Sciences 2010; 6(3): 138-42.
17. Jemima SA, Verghese S. Multiplex PCR for bla(CTX-M) & bla(SHV) in the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates. Indian J Med Res 2008; 128(3): 313-7.
18. Uemura S, Yokota S, Mizuno H, Sakawaki E, Sawamoto K, Maekawa K, et al. Acquisition of a transposon encoding extended-spectrum beta-lactamase SHV-12 by Pseudomonas aeruginosa isolates during the clinical course of a burn patient. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(9): 3956-9.
19. Leinberger DM, Grimm V, Rubtsova M, Weile J, Schroppel 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.
20. Alipour T, Sadeghifard N, Amirmozafari N, Ghafurian S, Abdulamir AS, Mohebi R, et al. Incidence of extended spectrum beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa and frequency of OXA-2 and OXA-10 genes. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2010; 4(8): 3202-7.
21. Danel F, Hall LM, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother 1995; 35(2): 281-94.

Journal of Isfahan Medical School Received: 18.04.2013

Vol. 31, No. 234, 1st Week, September 2013 Accepted: 05.07.2013

Frequency of Extended Spectrum β-Lactamase Genes in Pseudomonas Aerugionsa Isolates from Shiraz Hospital, Iran

Maryam Kownani MSc[1], Majid Baserisalehi PhD[2], Nima Bahador PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Nowadays, overuse of the antibiotics culminates in existence of antibiotic resistant bacteria with high frequency. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important pathogenic bacteria because of its resistance to beta lactam antibiotics. This character in *Pseudomonas aerugionsa* occurs because of extended spectrum β lactamase (ESBL) genes, which carry by transposons, plasmids and mutation. Therefore, the present study aimed to evaluate frequency of existence of OXA, PER, CTX-M1, CTX-M2 and CTX-M genes in pathogenic Pseudomonas aerugionsa isolates from different hospitals in Shiraz, Iran.

Methods: The pathogenic bacteria were isolated from hospitals in Shiraz during six months. Then, the isolates were identified and their antimicrobial sensitivity assessed by antibiogram test. In addition, ESBL genes in *Pseudomonas aerugionsa* were tested by disk double diffusion. Afterward, DNA of the isolates was extracted and the genes amplified by PCR method.

Findings: Out of 728 bacteria isolated from the clinical samples obtained from the patients of the hospitals in Shiraz, 62 *Pseudomonas aeruginosa* isolates harbored ESBL genes. The high level resistance character of *Pseudomonas aeruginosa* isolates was related to erythromycin, ampicillin, tetracycline and imipenem. In additiont highest frequency of ESBL was related to OXA-10, PER-1, CTX-M1, CTX-M2 and CTX-M3.

Conclusion: All of the antibiotic resistant genes of *Pseudomonas aeruginosa* located in choromosom. Hence, more investigations on ESBL genes such as OXA and the other genes in *Pseudomonas areuginosa* are necessary.

Keywords: Extended Spectrum β lactamase (ESBL), OXA gene, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiogram test

Citation: Kownani M, Baserisalehi M, Bahador N. **Frequency of Extended Spectrum β-Lactamase Genes in Pseudomonas Aerugionsa Isolates from Shiraz Hospital, Iran.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(243): 1007-17

1- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Shiraz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Science, Islamic Azad University, Kazeroun Branch, Kazeroun, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch Shiraz, Iran
Corresponding Author: Maryam Kownani MSc, Email: konani_maryam@yahoo.com