مقاله پژوهشی

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: درمجموع جدایه انسانی از عفونت‌های مختلف که جمع‌آوری‌شده، پس از جداسازی باکتری و استخراج DNA ژن‌های *vim* ، *gim*-1، *sim*-1، *imp*، *spm*-1 با روش multiplex PCR موردمطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: از ۷۰ جدایه نمونه‌های انسانی از عفونت‌های مختلف و از تمامی گروه‌های سنی جمع‌آوری‌شده، ژن‌های *sim-1*، *imp*، *vim*، *spm -1* ، *gim-1* جهت شناسایی مقاومت دارویی در *سودوموناس آئروژینوزا* از مجموع نمونه بالینی موردمطالعه تعداد ۶۱ نمونه(۸۷/۱۴درصد) از کل سویه‌ها مثبت بودند و ژن‌های VIM، *gim*-1،*sim*-1 در نمونه‌ها مشاهده گردید. ژن‌های *vim*، *gim-1*،*sim-1* در نمونه‌ها به ترتیب درصدهای ۲۱/۴۲ و ۲۷/۲۸ و ۲۴/۹۲را دارا هستند. دراین‌بین 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 کارباپنم‌ها ازلحاظ اپیدمیولوژیک و همچنین به‌منظور انتخاب آنتی‌بیوتیک مؤثر و جلوگیری از انتشار چنین عفونت‌هایی در بیمارستان‌ها لازم و باارزش است. از میان ژن‌های موردبررسی تنها دو ژن*imp* ، *spm*-1 مشاهده نشد درحالی‌که سایر ژن‌های مقاومت در جدایه‌ها به‌خوبی 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_amini@yahoo.com

مقدمه

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 وآماس پوست، عفونت های بافت های نرم، باکتریمی (وجود باکتری در خون) عفونت‌های استخوان و مفاصل، عفونت‌های معدی روده‌ای و عامل 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 بتالاکتام برای جامعه بشری خطرناک هستند. این مقاومت به علت ژن‌های بتالاکتاماز با طیف بسیار وسیع (Extended Spectrum β-

[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)

ESBL (Lactamase است که توسط ترانسپوزون ها و پلاسمیدها و یا موتاسیون در باکتری سودوموناس ایجاد می‌شود.

بتالاکتامازهای کلاس B یا متالوبتالاکتامازها (MBL) بر طیف و سیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله پنی سیلین‌ها و سفالو سپورین‌ها وسیع الطیف و کارباپنم‌ها (به‌جز مونوباکتام‌ها) مؤثرند و مشکل عمده بالینی بشمار می‌روند. این آنزیم‌ها به کاتیون‌های دوظرفیتی مثل فلز روی به عنوان کوفاکتور نیاز دارند. اولین آنزیم متالوبتالاکتاماز شناسایی شده IMP-1 در سراشیا مارسسنس در سال ۱۹۹۱ بود. در طی دهه های اخیر انواع MBL ها ازجمله *VIM*، *SPM*، *GIM* نیز شناسایی شده‌اند. سودوموناس آئروژینوزا مولد MBL اولین بار در ژاپن در سال ۱۹۹۱ گزارش شد و پس‌ازآن 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 کلاوولانیک اسید و سولباکتام و تازوباکتام که بازدارنده‌های آن هستند مهار نمی‌شوند. بازدارنده‌های آن‌ها در محیط آزمایشگاه شامل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، سدیم مرکاپتوا ستیک اسید و دی پیکولینیک اسید و غیره هستند (۴-۲).

باکتری های تولیدکننده بتالاکتاماز های 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 مهارکننده‌هایMBL (IMBL) در جنس باکتری‌های مورد آزمایش قرار دارد که علاوه بر این مهارکننده‌ها در ژن های *spm*-1، *gim*-1 دیده شد و نیز در پاتوژن های 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 آئروژینوزای* تولیدکننده ESBLs در کشور و افزایش مصرف کارباپنم‌ها در درمان عفونت‌های حاصل از آن‌ها و افزایش سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* تولیدکننده متالوبتالاکتامازها و مقاومت‌های چندگانه در بیمارستان‌ها دور از 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 آئروژینوزاهای* جداشده 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: جدایه 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 بیمار ستانی 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 آئروژینوزای* تولیدکننده MBL موردبررسی و پردازش قرار گرفتند. درنهایت 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 سیترات،تولید H2S،تولید ایندول وتحرک، احیای نیترات، اوره آز، تریپل شوگرآیرون آگار، دکربوکسیلاسیون اورنیتین ولیزین، DNase و تست اکسیداتیو فرمنتاتیو انجام گرفت(۷).

انتخاب آغازگرها (پرایمرها) : طراحی دقیق پرایمر برای به دست آوردن محصولات موردنظر در مقادیر مطلوب و جلوگیری از تکثیر توالی‌های غیراختصاصی ضروری است. معمولاً M ۱- ۰/۱ پرایمر در هر واکنش موردنیاز می‌باشد (جدول انتخاب پرایمر۱). ترادف آغازگرهای مورداستفاده در این تحقیق در جدول۱ ارائه‌شده است. آغازگرها طبق دستور شرکت سازنده با غلظت pm/µl ۱۰۰در آب مقطر حل شدند و با غلظت pm/µl ۱۰ در واکنش PCR در حجم µl ۲۵مورداستفاده قرار گرفتند.

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

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

پرایمر	توالی پرایمر (5' to 3')	ژن هدف	اندازه باند (bp)
IMP	5-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3 5-CCAAACYACTASGTTATCT-3	Imp	(bp ۱۸۸)
VIM	5-GATGGTGTTTGGTCGCATA-3 5-CGAATGCGCAGCACCAG-3	Vim	(bp ۳۹۰)
SPM-1	5-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3 5-ACATTATCCGCTGGAACAGG-3	Spm-1	(bp ۲۷۱)
GIM-1	5-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3 5-AACTTCCAACTTTGCCATGC-3	Gim-1	(bp ۴۷۷)
SIM-1	5-TACAAGGGATTCGGCATCG-3 5-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-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	

واکنش PCR چندگانه برای هر کدام از جفت پرایمر های مذکور به صورت جداگانه با مقادیر مشخص از سوسپانسیون نمونه در حجم ۲۵ میکرو لیتر صورت گرفت. لازم به ذکر است که تمام واکنش‌های PCR با نمونه کنترل منفی و مثبت (باکتری *اشریشیاکلی* تهیه شده از انستیتو پاستور ایران که دارای ژن‌های موردبررسی بود) انجام شد. با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، موقعیت و محل نمونه در ژل توسط رنگ‌آمیزی با غلظت‌های پایین محلول رنگ اریتروژل 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 بیمار ستانی تهران ذکر شده در توضیحات قبل، موارد به شرح زیر مشاهده گردید(جدول ۲).

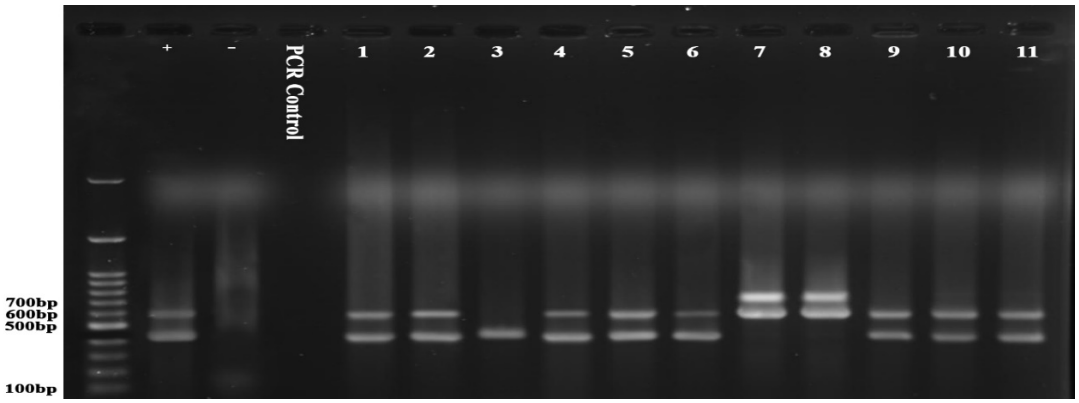
جدول(۳): میزان فراوانی نوع عفونت در بیماران موردمطالعه

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

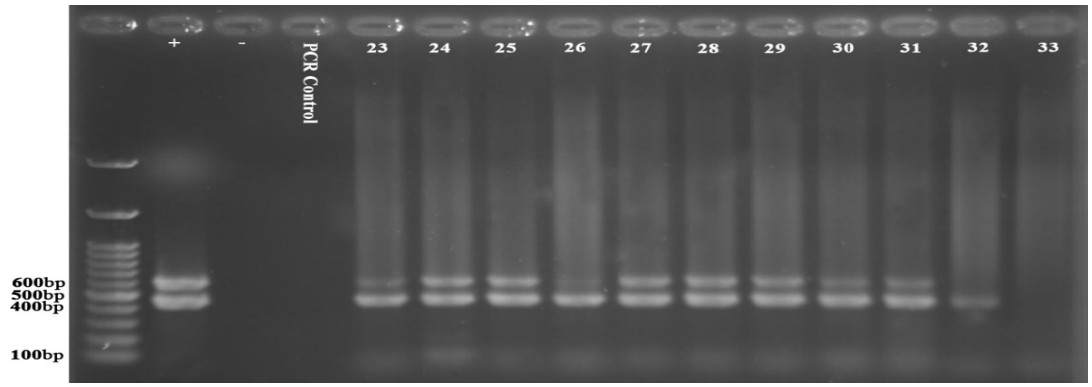
یافته‌های حاصل از واکنش Multiplex PCR جهت ردیابی ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* نمونه‌های انسانی : با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مجموع جدایه‌های نمونه بالینی، تعداد ۶۱ نمونه(۸۷/۱۴درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها مثبت بوده و تعداد ۹ نمونه(۱۲/۸۵درصد) از کل سویه‌ها منفی بودند.

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، GIM-1،SIM-1، IMP، SPM-1 از سمت چپ به ترتیب ستون مارکر۱۰۰bp، ستون کنترل مثبت، ستون کنترل منفی و ستون ۱۱-۱ سویه‌های 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، GIM-1،SIM-1، IMP، SPM-1 از سمت چپ به ترتیب ستون مارکر۱۰۰bp، ستون کنترل مثبت، ستون کنترل منفی و ستون ۳۳-۲۳ سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با دو باند مربوط به دو پرایمر GIM (۴۷۷)و SIM-1(۵۷۰)

بحث و نتیجه گیری

یکی از مسائل مهم در درمان بیماری‌های عفونی مقاومت باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. در تمامی تلاش‌ها به جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید ۳ فاکتور عمده یعنی شناسایی به‌موقع ایزوله‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز

وسیع 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 مورداستفاده علیه عفونت‌های سودوموناسی بسیار حائز اهمیت هستند. بررسی و تشخیص سریع این آنزیم‌ها در باکتری های مقاوم به کارباپنم ها ازلحاظ اپیدمیولوژیک و هم به‌منظور 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 باارزش 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 مقاومت های چندگانه به دیگر آنتی‌بیوتیک ها ارتباط دارند به‌طوری‌که 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 به‌دست‌آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش، تعداد ۶۱ نمونه(۸۷/۱۴درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها ازنظر حضور ژن های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه(۱۲/۸۵درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

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

Wodford و همکاران(۲۰۰۸) در ارتباط با تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* تولیدکننده بتالاکتاماز و سیع الطیف VEB در انگلستان مطالعه‌ایی انجام داده و گزارش دادند که از مجموع ۱۳۳۸ ایزوله ۴۹ ایزوله حدود ۳/۷درصد از نمونه‌ها تولیدکننده ESBLs هستند که از این میان ۳۲ ایزوله(۸۰درصد) حاوی ژن *veb* می‌باشند (۱۴).درحالی‌که با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش، تعداد ۶۱ نمونه(۸۷/۱۴درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها ازنظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه(۱۲/۸۵درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

Lim و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ایی که در رابطه با *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده در مالزی انجام شد، مشاهده کردند که اکثر ایزوله ها به آنتی‌بیوتیک هایی ازجمله تتراسایکلین (۷۳درصد) و کلرامفنیکل (۶۰درصد) به میزان بالا و به میزان کمتر به سفوتاکسیم (۴۰درصد) ، سفتریاکسون (۳۱درصد)، پیپراسیلین(۲۳درصد) آزترئونام مقاوم هستند. همچنین ۳۳ ایزوله از ۴۸ ایزوله (۶۹درصد) مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی نشان داده که این به‌منزله تولید ESBLs توسط این سویه‌ها می‌باشد(۱۵).

Das Neves و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود نشان دادند که بین مصرف داروهای ضد سودومونایی (آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم و ایمی پنم) 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 به‌دست‌آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش حاضر، تعداد ۶۱ نمونه(۸۷/۱۴درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها ازنظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه(۱۲/۸۵درصد) 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 ژن OXA نسبت به سایر ژن‌های موردبررسی بیشتر است (۱۷).

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

Peshattiwar 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 (۲۲/۲درصد) تولیدکننده ESBLs و

۱۰سویه (۷/۸درصد) تولیدکننده MBL هستند. هیچ‌کدام از سویه‌ها هم‌زمان تولیدکننده ESBLs و MBL نبودند. تمامی سویه های تولیدکننده ESBLs به ایمی‌پنم حساس بودند درحالی که سویه های تولیدکننده MBL به آمینوگلیکوزیدها، سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین همراه با تازوباکتم مقاومت نشان دادند (۱۹). در مقایسه با نتایج به‌دست‌آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش، تعداد ۶۱ نمونه(۸۷/۱۴درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها ازنظر حضور ژن های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه(۱۲/۸۵درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

توجهی و همکاران(۲۰۱۱-۲۰۱۰) به بررسی فراوانی بتالاکتاماز های وسیع الطیف(ESBLs) تولیدشده توسط سودوموناس آئروژینوزا جداشده 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 پیپراسیلین، ایمی پنم، سفوتاکسیم ، سفتریاکسون ، جنتامایسین، سفتازیدیم، آزترونام و سیپروفلوکساسین دیده شد. هفت سویه(۹/۲درصد) ESBLs مثبت بودند. ۲۷درصد از نمونه ها حداقل به سه کلاس از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. ۸تا 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 موردبررسی 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* ۱۰۰درصد به ایمی پنم، مروپنم و آمیکاسین ، ۵۰درصد به سیپروفلوکساسین و ۳۰درصد به جنتامیسین حساس هستند (۲۱). در مقایسه با نتایج به دست آمده از مجموع جدایه‌های پژوهش، تعداد ۶۱ نمونه(۸۷/۱۴درصد) از ۷۰ جدایه کل سویه‌ها ازنظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز مثبت بودند ولی تعداد ۹ نمونه(۱۲/۸۵درصد) از کل سویه‌ها فاقد ژن‌های بتالاکتاماز بود.

در این مطالعه و مقایسه با سایر مطالعات صورت گرفته از میان ژن‌های موردبررسی تنها دو ژن IMP، SPM-1 مشاهده نشد درحالی‌که سایر ژن‌های مقاومت در جدایه ها به‌خوبی قابل‌رؤیت بودند. در نقاط مختلف دنیا مطالعات زیادی راجع به *سودوموناس آئروژینوزا* و ژن‌های ESBLs صورت گرفته است حال با کمک روشPCR 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 ژن‌هایIMP، SPM-1 ، SIM-1, GIM-1, VIM با استفاده از روش Multiplex PCR پرداخته شد که از بین موارد موردبررسی 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 آنتی‌بیوتیک ها و همچنین منطقه جغرافیایی و اختلاف در منشأ اکولوژی سویه‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

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

References:

1.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.

2. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book: Elsevier Health Sciences; 2017: 75-89.

3. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002;8(6):321-31.

4. 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.

5. 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, Puthucheary 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. Peshattiwar 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.

Original Article

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

*Ehsan Strabaghi[1], Majid Sadeghpour[2], Sima Sotoudeh[3], 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)*