Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ پانزدهم، شمارهٔ ۱، ص ۱۷-۹، ۱۳۸۶

مقالهٔ پژوهشی

طرح پلاسمیدی سودوموناس آئروجینوزا و ارتباط آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بیمارستانی

دکتر نیما حسینی‌جزنی*[۱]، دکتر میرداود عمرانی[۲]، دکتر زهرا یکتا[۳]، دکتر رحیم نژادرحیم[۴]، شهره افشاریاوری[۵]، مینو زردشتی[۶]

خلاصه

مقدمه: سودوموناس آئروجینوزا یک باسیل گرم منفی عفونت‌زای فرصت‌طلب است که به علت مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل عفونت‌های ناشی ازآن یکی از مشکلات اصلی به‌حساب می‌آید. با توجه به اینکه بررسی الگوی هضم پلاسمیدی با آنزیم‌های محدودالاثر (Restriction enzyme analysis of plasmids) به عنوان روشی قابل اعتماد برای تعیین منشأ مقاومت دارویی مطرح است، مطالعه حاضر با هدف تعیین منشأ مقاومت دارویی سودوموناس آئروجینوزا با استفاده از روش مذکور صورت گرفت.

روش: در این مطالعه، ۱۴۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا ازمنابع بالینی جمع‌آوری شد و الگوی مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف تعیین شد. DNA پلاسمیدی ایزوله‌ها استخراج شد و باندهای پلاسمیدی حاصل شناسایی شد. برای تهیه باندهای خطی از برش آنزیمی باآنزیم‌های EcoRI و HincII استفاده شد و وزن ملکولی باندها تعیین شد.

یافته‌ها: میزان مقاومت ایزوله‌ها در برابر جنتامیسین۴۹/۳٪، سفالوتین۹۹/۳٪، تیکارسیلین ۱۰۰٪، سفتی‌زوکسیم ۷۹/۳٪، کوتری‌موکسازول ۹۷/۷٪، آمیکاسین ۳۵٪، کاربنی‌سیلین ۶۷/۱٪، سفتریاکسون ۶۵/۷٪، سیپروفلوکساسین ۵۸/۶٪، پیپراسیلین ۵۲/۸٪، ایمی‌پنم ۱/۴٪، کانامایسین ۶۵/۷٪، افلوکساسین ۷۲/۱٪ و آمپی‌سیلین ۱۰۰٪ بود. استخراج پلاسمیدی ایزوله‌ها وجود پلاسمید در ۶۵/۷٪ از نمونه‌ها را نشان داد. الگوی برشی یکسانی با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HincII از ایزوله‌های دارای پلاسمید حاصل شد. پلاسمیدی بودن منشأ مقاومت نسبت به سفتریاکسون و کانامایسین با روش حذف پلاسمیدی و ترانسفورماسیون پلاسمیدها به سویه فاقد پلاسمید E.coli DH5α مورد تأیید قرارگرفت. همچنین ارتباط معنی‌دار بین حضور پلاسمید در ایزوله‌ها و مقاومت نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص شد.

نتیجه‌گیری: شیوع بالای پلاسمید در باکتری‌های جداسازی شده دراین تحقیق مشاهده شد و بنابراین می‌توان گفت که پلاسمیدها نقش مهمی از نظر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های شایع در بیمارستان‌های تحت بررسی در این پژوهش را داشته‌اند.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروجینوزا، الگوی پلاسمیدی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

۱- استادیارمیکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، ایمنی‌شناسی و ژنتیک، ۲- دانشیار ژنتیک، گروه میکروب‌شناسی، ایمنی‌شناسی و ژنتیک، ۳- دانشیار پزشکی اجتماعی، ۴- استادیار بیماری‌های عفونی، ۵- مربی، گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی و بهداشت، ۶- کارشناس آزمایشگاه، گروه میکروب‌شناسی، ایمنی‌شناسی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی –درمانی ارومیه

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه میکروب‌شناسی –ایمنی‌شناسی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ارومیه

آدرس پست الکترونیک: n_jazani@umsu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸٦/۳/۷ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸٦/۸/۱۲ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۶/۸/۳۰

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا باسیل گرم منفی ازگروه باکتری‌های غیرتخمیرکننده گلوکز است. این باکتری بخشی از فلور طبیعی بوده و قادر به ایجاد عفونت در قسمت‌های مختلف بدن است. سودوموناس یک پاتوژن مهم فرصت‌طلب محسوب شده و عامل عفونت به‌ویژه در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروز و بیماران دچار سوختگی به‌شمار می‌آید. همچنین یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود. سودوموناس آئروجینوزا نسبت به بسیاری از عوامل ضدمیکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است و علاوه بر مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، در حین درمان نیز به سرعت در برابر دارو مقاوم می‌شود. در حال حاضر ظهور سویه‌های برخوردار از مقاومت دارویی چندگانه در بخش‌های مختلف بیمارستانی رو به افزایش است که یکی از مهم‌ترین مشکلات کنترل عفونت در بیمارستان‌ها می‌باشد (۱،۲).

منشأ ژنتیکی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها می‌تواند پلاسمیدی یا کروموزومی باشد. ژن‌های مقاومت با منشأ پلاسمیدی معمولاً بر روی پلاسمیدهایی قرار دارند که می‌توانند به سهولت بین سویه‌ها، گونه‌ها و حتی جنس‌های مرتبط منتقل شوند. بنابراین تعیین منشأ ژنتیکی مقاومت می‌تواند میزان سهولت انتقال مقاومت بین سویه‌ها و نیز احتمال افزایش شیوع سویه‌های برخوردار از مقاومت چندگانه را در نواحی تحت مطالعه مشخص کند.

بررسی الگوی پلاسمیدی ایزوله‌های بیمارستانی و الگوی هضم پلاسمیدها با آنزیم‌های محدودالاثر روشی قابل‌اعتماد برای تایپینگ باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی است. برخی از مطالعات تایپینگ سودوموناس آئروجینوزا با آنزیم‌های محدودالاثر را روش استاندارد طلایی جهت تعیین تیپ این باکتری ذکرکرده‌اند. با توجه به اینکه درمورد طرح پلاسمیدی سویه‌های بیمارستانی سودوموناس آئروجینوزا با استفاده ازآنزیم‌های محدودالاثر در ایران اطلاعات زیادی در دسترس نیست (۱،۳،۴)، انجام این تحقیق در بیمارستان‌های ایران ضروری به نظر می‌رسد.

در بررسی حاضر پس از جداسازی ایزوله‌های بیمارستانی سودوموناس آئروجینوزا، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، طرح پلاسمیدی و الگوی هضم پلاسمیدها با آنزیم‌های محدودالاثر و ارتباط بین طرح پلاسمیدی و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرارگرفت.

روش بررسی

جداسازی، تشخیص وآنتی‌بیوگرام ایزوله‌های باکتریایی: در بررسی حاضر ۱۴۰ ایزوله مختلف سودوموناس آئروجینوزا از بیمارستان‌های شهرستان ارومیه از خردادماه تا شهریورماه ۱۳۸۴ جمع‌آوری شد و با آزمایش‌های استاندارد شامل تست کاتالاز، اکسیداز، بررسی رشد در محیط کشت TSI، تولید گاز، تولید H_2S، SIM برای بررسی حرکت و تولید اندول، MR، VP، بررسی تولید رنگدانه و بررسی توانایی رشد باکتری در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، به عنوان ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا مورد تأیید قرار گرفتند (۵). آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی براساس روش انتشار در آگار (Agar disc diffusion)(۶) با کاربرد سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزای ATCC 27853 برای ۱۴ نوع آنتی‌بیوتیک مختلف شامل جنتامیسین، سفالوتین، تیکارسیلین، سفتی‌زوکسیم، کوتری‌موکسازول، آمیکاسین، کاربنی‌سیلین، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین، پیپراسیلین، ایمی‌پنم، کانامایسین، افلوکساسین وآمپی‌سیلین (HiMedia, India) انجام گرفت.

استخراج، خالص‌سازی و الکتروفورز DNA پلاسمیدی: برای استخراج DNA پلاسمیدی ازروش لیز قلیایی با کمی تغییرات استفاده شد. ایزوله‌ها در محیط کشت LB کشت داده شدند و پس از سانتریفوگاسیون رسوب سلولی در۱۰۰ میکرولیتر بافرGTE (حاوی ۲ میلی‌لیتر EDTA ۰/۵ مولار، ۱۰ میلی‌لیتر گلوکز ۰/۵ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر تریس ۱ مولار با pH=۸) حل شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده (حاوی ۱ میلی‌لیتر NaOH ۱ مولار و ۰/۵

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر SDS ۱۰٪) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در یخ انکوبه شد. سپس محلول استات سدیم سرد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در یخ قرارگرفت و پس از سانتریفوژ کردن نمونه، محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲۴:۲۵ به محلول رویی اضافه شد و پس از سانتریفوگاسیون محلول رویی جداسازی و با افزودن ایزوپروپانل به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب سفیدرنگ باقیمانده با اتانل سرد ۷۰٪ شستشو داده شد و پس از سانتریفوگاسیون، مایع رویی دور ریخته و میکروتیوپ آب‌گیری شد. در انتها ۵۰ میکرولیتر از بافر (حاوی pH=۸Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار و EDTA ۱ میلی‌مولار حاوی آنزیم RNase) بر روی رسوب ریخته شد و رسوب درآن حل گردید (۱) و DNA پلاسمیدی بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شد. باندهای پلاسمیدی حاصل با دستگاه ترانس ایلومیناتور مورد بررسی قرارگرفت و درصد ایزوله‌های حاوی پلاسمید محاسبه شد (۷).

تهیه باندهای خطی از پلاسمیدها: پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از آنزیم‌های EcoRI (Fermentase) و HincII (سیناژن) مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده برش داده شدند و پس از لود نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ وزن ملکولی باندهای حاصل با استفاده از مارکر ملکولی (۱۲۰۰۰-۱۰۰ جفت بازی) تعیین شد.

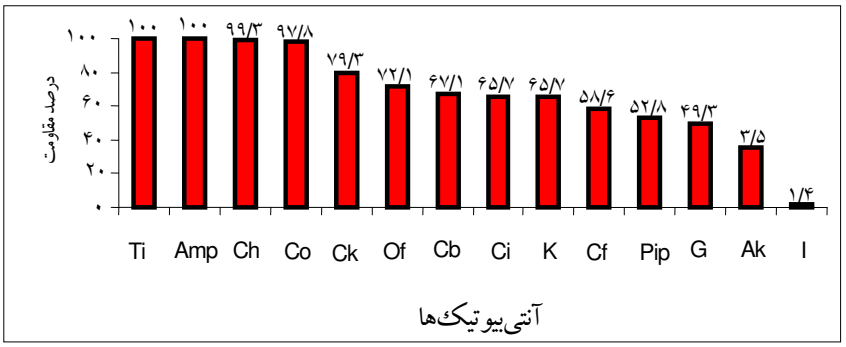
حذف و ترانسفورماسیون DNA پلاسمیدی: حذف پلاسمیدی با کشت باکتری‌های واجد پلاسمید در ۴۳ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها قبل و بعد از اعمال روش حذف پلاسمیدی تعیین شد (۸). ترانسفورماسیون DNA پلاسمیدی با استفاده از کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد و شوک حرارتی در ۴۲ درجه سانتی‌گراد در E.coli DH5α انجام گرفت و انتقال پلاسمید حاوی ژن مقاومت درکلنی‌های حاصل با استخراج پلاسمیدی و مشاهده باند مربوطه مجدداً تأیید شد (۷،۸).

برای بررسی ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور یا عدم حضور پلاسمید در ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا از آزمون آماری χ^2 یا Fisher's exact test استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه ۱۴۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا جداسازی شدند. این ایزوله‌ها شامل۹۳ ایزوله از ادرار (۶۶/۴٪)، ۲۷ ایزوله از زخم (۱۹/۲٪)، ۱۵ ایزوله از خلط (۱۰/۷٪)، ۳ ایزوله از خون (۲/۱٪)، ۱ ایزوله از مدفوع (۰/۷٪) و ۱ ایزوله ازگوش (۰/۷٪) بود. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

استخراج پلاسمیدی ایزوله‌ها وجود پلاسمید در ۶۵/۷٪ از نمونه‌ها (۹۲ نمونه) را نشان داد (شکل۲).

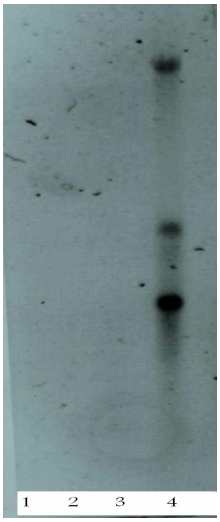


شکل ۱: *میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا*

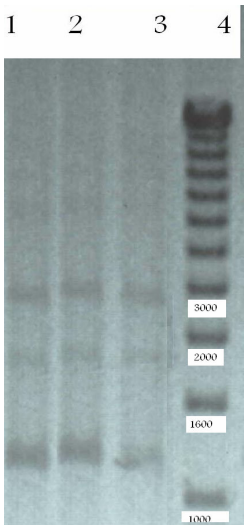
(Ti: تیکارسیلین، Amp: آمپی‌سیلین، Ch: سفالوتین، Co: کوتری‌موکسازول، K: کانامایسین، Of: اوفلوکساسین، Ck: سفتی‌زوکسیم، Cb: کاربنی‌سیلین، Pip: پیپراسیلین، G: جنتامیسین، Ci: سفتریاکسون، Cf: سیپروفلوکساسین، I: ایمی‌پنم، Ak: آمیکاسین.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: *الکتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج شده از ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا*



شکل ۳: *الکتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج شده پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های تحدیدی HincII و EcoRI*

چاهک ۴ مربوط به یک ایزوله واجد پلاسمید است. چاهک ۲ و ۳ مربوط به ایزوله‌های فاقد پلاسمید و چاهک ۱ مربوط به E.coli DH5α (کنترل منفی) است. ایزوله‌های واجد پلاسمید از الگوی سه باندی برخوردارند.

برای مشخص نمودن باندهای Open Circular از باندهای Covalently Closed Circular از روش هضم آنزیمی پلاسمیدها استفاده شد. الگوی برشی سویه‌های دارای پلاسمید با وزن مولکولی یکسان در شکل۳ نشان داده شده است.

با توجه به مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها وپروفیل پلاسمیدی در ایزوله‌های دارای پلاسمید، بین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفتریاکسون وکانامایسین و حضور پلاسمید ارتباط کامل مشاهده شد. همچنین آزمون آماری نشان داد که بین حضور پلاسمید در ایزوله‌های جداسازی شده و مقاومت نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط معنی‌دار وجود دارد (جدول۲).

بین حضور پلاسمید و مقاومت نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها (آمیکاسین، کانامایسین، اوفلوکساسین، جنتامیسین، سفتریاکسون، کاربنی‌سیلین و پیپراسیلین) ارتباط معنی‌داری وجود دارد.

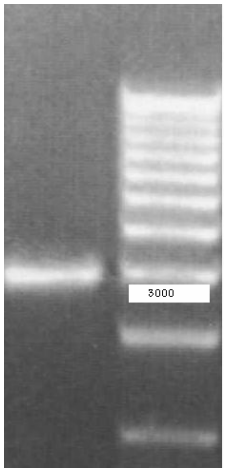
کلیه سویه‌هایی که تحت روش حذف حرارتی پلاسمیدی قرارگرفته بودند، قبل از حذف پلاسمیدی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون وکانامایسین مقاوم و پس از حذف پلاسمیدها نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند. در آنالیز پلاسمیدی ایزوله‌های ترانسفورم شده یک باند پلاسمیدی مشاهده شد (شکل۴). پس از هضم آنزیمی باند پلاسمیدی حاصل، وزن مولکولی این باند حدوداً ۳ کیلو جفت بازی تعیین شد. نتایج حاصل از ترانسفورماسیون و آنتی‌بیوگرام متعاقب آن نشان دادکه ایزوله‌های ترانس‌فورم شده با پلاسمیدهای جداسازی شده مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون را کسب نمودند ولی با توجه به اینکه عمل ترانسفورماسیون تنها در انتقال یکی از باندهای پلاسمیدی ۳گانه به E.coli DH5α موفق بود، سویه ترانس فورم شده هم‌چنان نسبت به کانامایسین حساس باقی ماند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: *ارتباط موجود بین حضور و یا عدم حضور پلاسمید و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با استفاده از آزمون χ^2 یا Fisher's exact test*

مقاومت / آنتی‌بیوتیک	نسبت سویه‌های مقاوم حاوی پلاسمید به کل سویه‌های پلاسمیددار	نسبت سویه‌های مقاوم فاقد پلاسمید به کل سویه‌های فاقد پلاسمید	P value
تیکارسیلین	٪۱۰۰	٪۱۰۰	P›۰/۰۵
آمپی‌سیلین	٪۱۰۰	٪۱۰۰	P›۰/۰۵
کوتریموکسازول	٪۹۹	٪۹۶	P›۰/۰۵
سفالوتین	٪۱۰۰	٪۹۸	P›۰/۰۵
سفتی‌زوکسیم	٪۸۳/۶	٪۷۰/۸	P=۰/۰۷۵ K=۳/۱۷
آمیکاسین	٪۵۳/۲	۰	P=۰/۰۰۰
کانامایسین	٪۱۰۰	۰	P=۰/۰۰۰
اوفلوکساسین	٪۷۸/۳	٪۶۰/۴	P=۰/۰۲۵ K= ۴/۹۹
جنتامیسین	٪۶۰/۸	٪۲۷/۱	P=۰/۰۰۰ K=۱۴/۴
سفتریاکسون	٪۱۰۰	۰	P=۰/۰۰۰
ایمی‌پنم	٪۱۰۰	٪۹۵/۸	P= ۰/۱۱۶
کاربنی‌سیلین	٪۷۸/۳	٪۴۳/۷	P= ۰/۰۰۰ K=۲۶/۷
سیپروفلوکساسین	٪۶۳	٪۵۰	P= ۰/۱۳۷
پیپراسیلین	٪۶۵/۲	٪۲۹/۱	P= ۰/۰۰۰ K=۱۶/۴۵



شکل ۴: *الکتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج شده از سویه ترانس فورم شده E.coli DH5α پس از هضم آنزیمی با آنزیم EcoRI*

چاهک۱ حاوی مارکر خطی و چاهک ۲ حاوی پلاسمیدهای ترانسفورم شده خطی شده با آنزیم EcoRI است.

بحث

سودوموناس آئروجینوزا یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب و عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است. درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی به خصوص در بخش مراقبت‌های ویژه و سوختگی به شمار می‌آید که علت اصلی آن مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی این باکتری است (۱،۹،۱۰).

با توجه به مطالعه حاضر، مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا به ترتیب ایمی‌پنم، آمیکاسین، جنتامیسین، پیپراسیلین و سیپروفلوکساسین می‌باشند. در مقایسه با مطالعات مشابه، سویه‌های جداسازی شده در بررسی حاضر مقاومت بالاتری

www.SID.ir

Archive of SID

را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهند. در بررسی که در سال ۱۳۸۴ در بیمارستان‌های تهران انجام شده است میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنم ۱٪، امیکاسین ۲۲٪، سیپروفلوکساسین ۲۴٪، جنتامیسین ۳۴٪ و سفتریاکسون ۴۴٪ (۱) و در بررسی حاضر به ترتیب ۱/۴٪، ۳۵٪، ۵۸/۶٪، ۴۹/۳٪ و ۶۵/۷٪ بوده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ در کشور انگلستان بر روی ۲۰۶۷ ایزوله بالینی سودوموناس آئروجینوزا انجام شد، میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنم ۶/۷٪، آمیکاسین ۳/۹٪، سیپروفلوکساسین ۷/۳٪ و جنتامیسین ۹/۱٪ در ایزوله‌های به دست آمده بود (۱۰). در جمع‌بندی نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات به‌نظر می‌رسد بهترین داروهای ضدسودوموناسی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی آمیکاسین، از بتالاکتام‌ها ایمی‌پنم و ازکینولون‌ها سیپروفلوکساسین می‌باشد (۱،۹،۱۱،۱۲).

DNA پلاسمیدی در این پژوهش در ۶۵/۷٪ از ایزوله‌ها مشاهده شد. تعداد پلاسمیدهای جداسازی شده در کلیه ایزوله‌های حاوی پلاسمید در این مطالعه به صورت الگوی سه‌تایی بود، البته در بررسی که توسط فرجادیان و همکاران در سال ۱۹۹۶ بر روی ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزای جداسازی شده از بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها انجام گرفت مشخص شدکه ایزوله‌های حاوی پلاسمید تنها حاوی ۲ باند پلاسمیدی بوده و تمامی ایزوله‌های حاوی پلاسمید الگوی مشابهی را نشان می‌دهند (۳). وزن مولکولی پلاسمیدهای شناسایی شده در بررسی حاضر به ترتیب حدوداً ۱/۲، ۱/۹ و ۳ کیلوجفت بازی بود. در بررسی انجام گرفته توسط فرجادیان وزن مولکولی پلاسمیدهای جداسازی شده به‌طور تقریبی ۲/۵ و ۳ کیلو جفت بازی گزارش شده است (۳) که با وزن ملکولی پلاسمیدهای حاصل در بررسی حاضرتقریباً مشابه است. البته در بررسی فوق‌الذکر تنها ۴/۳٪ ایزوله‌ها واجد پلاسمید بودند. در بررسی انجام گرفته توسط فرجادیان و همکاران، ایزوله‌های حاوی پلاسمید الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی کاملاً یکسانی را نشان دادند (۳)، در حالی که در بررسی حاضر ایزوله‌های پلاسمیددار علی‌رغم اینکه الگوی پلاسمیدی کاملاً یکسانی را نشان می‌داند ولی متعلق به آنتی‌بیوتیپ‌های گوناگونی می‌باشند.

مطالعات دیگری که در سال‌های اخیر بر روی شیوع پلاسمید در سویه‌های مختلف سودوموناس ائروجینوزا در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته است این میزان را ۱۸٪، ۱۵٪ و ۳۱/۹٪ گزارش نموده‌اندکه نشان‌دهنده ارقام کمتر از میزان مشاهده شده در پژوهش حاضر است (۱،۱۱،۱۳،۱۴). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که شیوع پلاسمید در ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزا رو به افزایش است.

در بررسی حاضر بین حضور پلاسمید و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون وکانامایسین ارتباط کامل مشاهده شد. البته در برخی از مطالعات انجام شده در این زمینه هیچ‌گونه ارتباطی بین حضورپلاسمید و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس ائروجینوزا مشاهده نشده است (۳،۱۵). سایر مطالعات ارتباط معنی‌دار بین حضور برخی از پلاسمیدها و مقاومت نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها را گزارش نموده‌اند (۱).

بهترین روش برای تبدیل DNA سوپرکویل به شکل حلقوی باز برش دادن پلاسمید با آنزیم‌های محدودالاثر است. در این پژوهش ایزوله‌های دارای پلاسمید با آنزیم‌های محدودالاثر EcoR1 و HincII برش داده شدند و الگوهای برشی آنها با یکدیگر مقایسه شد، نتایج به‌دست آمده حاکی از تشابه الگوهای برشی در کلیه ایزوله‌های تحت بررسی بودکه احتمالاً نشان‌دهنده منشأ یکسان پلاسمیدها در ایزوله‌های حاوی پلاسمید و یا شیوع بالای انتقال ژن بین ایزوله‌های تحت مطالعه است (۱۶).

برای اثبات ارتباط بین حضور پلاسمید و مقاومت نسبت به یک آنتی‌بیوتیک خاص بهترین روش حذف پلاسمید و اثبات حساس شدن باکتری نسبت به آن آنتی‌بیوتیک خاص و یا انتقال پلاسمید جداسازی شده به باکتری حساس فاقد پلاسمید است. نتایج حاصل از حذف پلاسمیدی نشان دهنده پلاسمیدی بودن منشأ مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون و کانامایسین است. پس از اعمال روش استخراج پلاسمید و الکتروفورز ایزوله‌هایی که

www.SID.ir

Archive of SID

تحت روش حذف پلاسمیدی قرارگرفته بودند، مشخص شدکه باندهای پلاسمیدی این ایزوله‌ها حذف شده است. با توجه به اینکه قبلاً نشان داده شده است که روش تیمار حرارتی به منظور حذف پلاسمیدهای سبک‌تر کارا می‌باشد و با توجه به کم‌وزن بودن کلیه باندهای پلاسمیدی شناسایی شده در این مطالعه، به نظر می‌رسدکه روش فوق‌الذکر از کارایی کافی برای حذف باندهای پلاسمیدی برخوردار بوده است (۸).

نتایج حاصل از ترانسفورماسیون پلاسمیدها در E.coli DH5α و آنتی‌بیوگرام متعاقب آن نشان دادکه سویه ترانس‌فورم شده مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون را کسب نمود و آنالیز پلاسمیدی متعاقب آن نشان دادکه سویه ترانس‌فورم شده تنها یک باند پلاسمیدی (۳ کیلو جفت بازی) را کسب نموده است، ولی دو پلاسمید سبک‌تر به E.coli DH5α منتقل نشدند. یکی از دلایل عدم انتقال برخی از پلاسمیدها به میزبان، عدم قابلیت همانندسازی پلاسمید در این میزبان می‌باشد. با توجه به اینکه پلاسمیدها دارای محدوده میزبانی متفاوتی می‌باشند، احتمالاً پلاسمید ۳ کیلو جفت بازی دارای محدوده میزبانی وسیع بوده و قادر است به راحتی در میزبان جدید تکثیر یابد، در صورتی که دو پلاسمیدکوچک‌تر احتمالاً دارای محدوده میزبانی محدود بوده و قادر به تکثیر در اشرشیاکلی نمی‌باشند.

با توجه به اینکه سویه‌های ترانسفورم شده تنها مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون را کسب نمودند و با توجه به اینکه تنها باند پلاسمیدی ۳ کیلو جفت بازی به سویه‌های ترانس‌فورم شده انتقال یافته است، لذا می‌توان نتیجه گرفت که ژن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون بر روی این پلاسمید قرار دارد.

در مجموع در مورد ایزوله‌های مورد بررسی در این پژوهش می‌توان ادعا نمودکه ژن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی کروموزوم و یا پلاسمید باکتری قرار دارد، لذا استفاده از روش‌های بررسی کروموزومی درکنار آنالیز پلاسمیدی برای بدست آوردن اطلاعات اپیدمیولوژیک درجهت به کارگیری استراتژی‌های مفیدتر در کنترل و پیشگیری عفونت‌های بیمارستانی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها مفید است.

سپاسگزاری

هزینه انجام این طرح تحقیقاتی به وسیله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی آذربایجان غربی تأمین شده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و شورای پژوهشی دانشگاه تشکر به‌عمل می‌آید. هم‌چنین از سرکار خانم دکتر احیاء عبدی عالی استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه الزهرا و جناب آقای دکتر حمیدرضا خلخالی، عضو هئیت علمی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه کمال تشکر را داریم.

www.SID.ir

Archive of SID

Summary

Plasmid Profile of *Pseudomonas aeruginosa* and its Relation with Antibiotic Resistance in Hospital Isolates.

Hosseini Jazani N., Ph.D.[1], Omrani M.D., Ph.D.[2], Yekta Z., M.D.[3], Nejadrahim R., M.D[4], Afshar Yavari Sh., M.Sc.[5], Zartoshti M., B.Sc.[6]

1. Assistant professor of Microbiology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
2. Associate Professor of Genetics, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
3. Associate Professor of Social Medicine, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
4. Assistant Professor of infectious diseases, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
5. Instructor, Lab Sciences Department, School of Health & Paramedicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
6. Lab. Expert, Microbiology Department, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Introduction: *P.aeruginosa* is one of the causes of nosocomial infections with an unusual resistance to antibiotics. The source of resistance in this bacterium may be chromosomal or plasmid. The aim of the present study was to investigate the antibacterial susceptibility patterns with the presence of plasmids in *P. aeruginosa* isolates.

Method: In this study, 140 *P.aeruginosa* isolates were collected from hospitals in Urmia/Iran. The susceptibility patterns were determined against antibiotics. Plasmids were extracted by alkaline lysis method, electrophoresed and investigated by a UV transilluminator. Single digestion of plasmids with EcoR1 and HincII were performed and the restriction patterns were compared using a ladder.

Results: The rates of resistances to antibiotics were as follows: gentamicin 49.3%, cephalothin 99.3%, ticarcillin 100%, ceftizoxime 79.3%, co-trimoxazole 97.7%, amikacin 35%, carbenicillin 67.1%, ceftriaxone 65.7%, ciprofloxacin 58.6%, piperacillin 52.8%, imipenem 1.4%, kanamycin 65.7%, ofloxacin 72.1% and ampicillin 100%. In Whole, 65.7% of isolates harbored plasmids. Restriction enzyme analysis of plasmids showed unique pattern for all of plasmid positive isolates. All the plasmid positive isolates were resistant to ceftriaxone and kanamycin. The plasmid source of resistance to ceftriaxone was proved by plasmid elimination and transformation in E.coliDH5α and the plasmid source of resistance to kanamycin was proved by plasmid elimination. Also there was a significant correlation between the presence of plasmid in isolates and resistance to some of antibiotics.

Conclusion: There was a high frequency of plasmids in *P.aeruginosa* isolates, indicating that plasmids have an important role in transferring of resistance genes in this bacterium.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, plasmid pattern, Antibiotic resistance

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2008; 15(1): 9-17

منابع

۱. عبدی عالی، احیاء؛ سادات نیک‌بین، وجیهه؛ فیض‌آبادی، محمدمهدی ؛ غروی، سارا و فلاحی، زهراء. مطالعه پروفیل پلاسمیدی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروجینوزای بیمارستانی. مجله زیست‌شناسی ایران، ۱۳۸٤، دوره ۱۸، شماره ۲، ص ۹-۱٤۱.

2. Brooks G.F, Bautel J, Morse S. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed., USA, McGraw-Hill Medical, 2004; pp 262-5.

3. Farjadian S, Kaviani MJ, Ghaderi A. Molecular analysis of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in Shiraz. *Irn J Med Sci* 1996; 21(3&4): 118-23.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Freitas AL, Barth AL. Typing of Pseudomonas aeruginosa from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(1) 77-82.

5. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Trevino E. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 10th ed., USA, C.V. Mosby., 1998; pp 387-402.

6. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JM, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(4): 493-6.

7. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning A laboratory manual. 3rd ed., New York, CSHL press, 2001; pp 1.1-1.34, 5.1-5.17.

۸ فردوسیان، فرشته. بررسی الگوی مقاومت دارویی و پلاسمیدی سویه‌های کلبسیلای جدا شده از عفونت‌های ادراری. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. رشته میکروب‌شناسی پزشکی، سال ۱۳۸۱، شماره پایان‌نامه ۳۱۱۱۶۱۲.

9. Corona-Nakamura AL, Miranda-Novales MG, Leanos-Miranda B, Portillo-Gomez L, Hernandez-Chavez A, Anthor-Rendon J et al. Epidemiologic study of Pseudomonas aeruginosa in critical patients and reservoirs. *Archiv Med Res* 2001; 32(3): 238-42.

10. Lambert PA. Mechanisms of Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. *R Soc Med* 2002; 95 supple 41: 22-26.

11. Douglas MW, Mulholland K, Denyer V, Gottlieb T. Multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa outbreak in a burns unit- an infection control study. *Burns* 2001; 27(2): 131-5.

12. Shahid M, Malik A, Sheeba. Multi-resistant Pseudomonas aeruginosa strains harbouring R-plasmids and AmpC β lactamases isolated from hospitalized burn patients in a tertiary care hospital of north India. *FEMS Microbial Let* 2003; 228(2): 181-6.

13. Plesiat P, Alkhalaf B, Michel-Briand Y. Prevalence and profiles of plasmids in Pseudomonas aeruginosa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7(2): 261-4.

14. Poh CL, Yap EH, Tay L, Bergan T. Plasmid profiles compared with serotyping and pyocin typing for epidemiological surveillance of Pseudomonas aeruginosa. *J Med Microbiol*. 1998; 25(2): 109-14.

15. Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (Iran). Burns 2003; 29(2): 547-51.

۱۶. صادقی، جاوید؛ نهایی، محمدرضا و اصغرزاده، محمد. تعیین الگوی پلاسمیدی اشرشیاکلی‌های جدا شده از عفونت‌های ادراری بیماران بستری و سرپایی در مرکز آموزشی- درمانی امام خمینی. مجله دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ۱۳۸٤، دوره ۲۷، شماره ۲، ص ۵۸-۵۱.

www.SID.ir