مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۰، شمـاره‌ی ۸۲، آذر و دی ۱۳۹۱، صفحات ٤٤ تا ۵۳

تشخیص ژن‌های bla_{TEM-1}، bla_{SHV-1}، bla_{SHV-5}، $bla_{CTX-M-1}$، $bla_{CTX-M-2}$، $bla_{CTX-M-3}$، $bla_{CTX-M-9}$، bla_{OXA-1}، bla_{GES-1} و bla_{GES-2} درایزوله‌های پسودوموناس ائروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی بیمارستان شهید بهشتی کاشان

زهرا توجّهی[1]، دکتر رضوان منیری[2]، دکتر احمد خورشیدی[3]، مهدی روحانی[4]

نویسنده‌ی مسوول: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده‌ی پزشکی، گروه میکروب شناسی و ایمنولوژی moniri@kaums.ac.ir

دریافت: ۹۰/۱۲/۲۵ پذیرش: ۹۱/٤/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: *پسودوموناس ائروژینوزا یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای ایجاد کننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی است. در این مطالعه الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در پسودوموناس ائروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی به روش فنوتیپی و ژنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *این مطالعه‌ی توصیفی بر روی ۱۰۰ سویه پسودوموناس ائروژینوزا جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی و محیطی بیمارستان شهید بهشتی کاشان در سال ۱۳۸۹ انجام پذیرفت. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ۸ عامل ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. سویه‌های مولد ESBLs توسط تست Double-Disk-Diffusion تأیید گردید. ژن‌های bla_{TEM-1}، bla_{SHV-1}، bla_{SHV-5}، $bla_{CTX-M-1}$، $bla_{CTX-M-2}$، $bla_{CTX-M-3}$، $bla_{CTX-M-9}$، bla_{OXA-1}، bla_{GES-1} و bla_{GES-2} از طریق PCR شناسایی شد.*

یافته‌ها: *در این مطالعه به‌ترتیب بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین ۳۶ درصد و کمترین مقاومت به سیپروفلوکساسین ۱۶ درصد نشان داده شد. ۳۰ درصد از کل نمونه‌ها به حداقل سه نوع آنتی‌بیوتیک، مقاوم بودند. با استفاده از تست Double-Disk-Diffusion، ۸ درصد سویه‌ها، ESBL مثبت بودند. طبق نتایج PCR، ۸ سویه دارای ژن bla_{GES-2}، ۲ سویه دارای ژن bla_{SHV-1} و ژن bla_{SHV-5} و ۱ سویه دارای ژن $bla_{CTX-M-1}$ بودند.*

نتیجه‌گیری: *ژن bla_{GES-2} پروفیل هیدرولیز گسترده‌ای شامل ایمی‌پنم را دارا می‌باشد. این ژن که نقش مهمی را در ایجاد مقاومت به ایمی‌پنم ایفا می‌کند، در همه‌ی سویه‌های مولد ESBLs مشاهده گردید. پسودوموناس ائروژینوزای دارای bla_{GES-2} برای اولین بار در ایران گزارش گردید.*

واژگان کلیدی: بتالاکتاماز وسیع الطیف، پسودوموناس ائروژینوزا، تشخیص مولکولی، ژن، مقاوم به چند دارو

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا (س)، تهران
۲- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریحی
۳- دکترای تخصصی میکروب شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کاشان
٤- دانشجوی دکترای تخصصی میکروب شناسی، انستیتو پاستورایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

پسودوموناس ائروژینوزا در سراسر جهان به‌عنوان یک ارگانیسم فرصت طلب، شناخته شده است (۱) بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) مهار شونده به‌وسیله کلاولانیک اسید که باعث مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف می‌شوند، برای اولین بار در انتروباکتریاسه و سپس در *پسودوموناس ائروژینوزا* گزارش شده‌اند (۲). مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در این باکتری سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های آن می‌گردد (٤ و۳). ژن‌های ESBLs با ایجاد مقاومت‌های چندگانه به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط دارند، به‌طوری که بروز و انتشار ژن‌های مختلف ESBLs به علت افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، خصوصاً به صورت چند دارویی، مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها ایجاد کرده است (۵). ESBL ها بر اساس طبقه‌بندیAmbler به چهار دسته A تا D تقسیم می‌شوند (٦). اخیراً چندین بتالاکتاماز وسیع الطیف از دسته‌های A، B و D در *پسودوموناس ائروژینوزا* شناسایی و گزارش شده‌اند (۷). ESBL های مشتق از TEM و SHV مربوط به آنزیم‌های گروه A می‌باشند (۸). متداول‌ترین گروه از ESBL ها که به خانواده‌ی آنزیم‌های TEM یا SHV تعلق ندارد، CTX-M نام دارد که علت نامگذاری این خانواده، فعالیت بالای آن‌ها بر روی سفوتاکسیم می‌باشد (۹). گروه دیگری از بتالاکتامازهای وسیع الطیف به‌دلیل توانایی هیدرولیز اگزاسیلین، خانواده‌ی OXA نامیده می‌شوند (٦). این آنزیم در سویه‌های *پسودوموناس ائروژینوزا* از شیوع بیشتری برخوردارند (۱۱و۱۰). گروه دیگری از ESBL ها به نام GES (Guiana Extended Spectrum) برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ میلادی در نمونه‌ی بالینی *کلبسیلا پنومونیا* جدا شده از Guiana فرانسه کشف شد (۱۲). تاکنون، ۹ آنزیم ESBL نوع GES در گونه‌های مختلف پاتوژن از جمله *پسودوموناس ائروژینوزا* شناسایی شده است (۱۲). GES-۱ فعالیت هیدرولیتیکی مشابه با ESBL های کلاس A دارد و به‌وسیله‌ی مهارکننده‌های بتالاکتاماز مهار می‌شود (۱۳). بعضی از مشتقات GES مانند GES-۲، GES-٤، GES-۵ و GES-٦ فعالیت هیدرولیتیکی علیه کاربا‌پنم‌ها نیز دارند (١٤). GES-۱، GES-۲، GES-۵، GES-۸ و GES-۹ آنزیم‌های گزارش شده در *پسودوموناس ائروژینوزا* می‌باشند (۱۵). با توجه به افزایش شیوع ایزوله‌های *پسودوموناس ائروژینوزا* تولید کننده‌ی ESBLs درمراکز درمانی بسیاری از کشورها، عدم آگاهی از میزان آن در بیمارستان آموزشی شهید بهشتی کاشان و به‌منظور تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در*پسودوموناس ائروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیط مرطوب (دست‌شویی، محل دوش گرفتن) بیمارستان و تعیین تایپ‌های مختلف ESBLs تولیدی، این مطالعه انجام پذیرفت. هدف از این مطالعه تعیین ژن‌های $bla_{TEM-۱}$، $bla_{SHV-۱}$، $bla_{SHV-۵}$، $bla_{CTX-M-۱}$، $bla_{CTX-M-۲}$، $bla_{CTX-M-۳}$، $bla_{CTX-M-۹}$، $bla_{OXA-۱}$، $bla_{GES-۱}$ و $bla_{GES-۲}$ *در ایزوله‌های پسودوموناس ائروژینوزا جدا شده از بیمارستان آموزشی شهید بهشتی کاشان بود.*

روش بررسی

ایزوله‌های باکتری: در این مطالعه‌ی توصیفی که در سال ۱۳۸۹ انجام پذیرفت، تعداد ۱۳۲ نمونه‌ی مختلف از جمله ادرار، مدفوع، خون، زخم، چرک، خلط، مایع جنب، ترشحات لوله‌ی تراشه، ترشحات لوله‌ی گوارش، ترشحات برونکوسکوپی، ترشحات واژن از بیماران بستری و محیط مرطوب (دستشویی، محل دوش گرفتن) بیمارستان شهید بهشتی کاشان جمع‌آوری شدند، که از بین آن‌ها ۱۰۰ ایزوله *پسودوموناس ائروژینوزا* بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف از جمله تست اکسیداز مثبت، تولید پیگمان در محیط

Archive of SID

www.SID.ir

مولر هینتون آگار، وضعیت غیرتخمیری در محیط TSI، تست OF هوازی مثبت و بی‌هوازی منفی مورد شناسایی قرار گرفتند و در محیط TSB حاوی ۱۰ درصدگلیسرول در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا در این مطالعه مورد استفاده قرار گیرند.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تأیید فنوتیپی سویه‌های مولد ESBLs: آزمایشات حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن طبق معیار CLSI (مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی) و با تهیه‌ی سوسپانسیون نیم مک فارلند و کشت روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت Merck آلمان) انجام پذیرفت (١٦). *پسودوموناس ائروژینوزا* ATCC ٢٧٨٥٣ به‌عنوان کنترل کیفی مورد استفاده قرار گرفت. تمامی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت Mast انگلیس خریداری شدند. آنتی‌بیوتیک‌های تست شده شامل سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰ میکروگرم)، پیپراسیلین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم) و ایمی‌پنم (۳۰ میکروگرم) بودند. سویه‌های مقاوم به حداقل سه کلاس آنتی‌بیوتیک (کارباپنم‌ها، فلوروکوئینولون‌ها، پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها و آمینوگلیکوزیدها) به‌عنوان سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR)، در نظر گرفته شدند. ایزوله‌های *پسودوموناس ائروژینوزا* براساس روش Double-Disk-Diffusion از نظر حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش سویه‌های *پسودوموناس ائروژینوزا* در پلیت مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس دیسک‌های ۳۰ میکروگرمی سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و آزترونام، لبه به لبه به فاصله‌ی ۲۰ میلی‌متری از یکدیگر در سطح پلیت قرار داده شد. در پلیت دوم نیز، دیسک‌های ۳۰ میکروگرمی سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و آزترونام، لبه به لبه به فاصله‌ی ۲۰ میلی‌متری از یکدیگر قرار داده و در مرکز پلیت یک دیسک ۳۰ به ۱۰ میکروگرمی آموکسی سیلین- اسید کلاولانیک قرار داده شد. افزایش قطر هاله‌ی مهاری بیش از ۵ میلی‌متر در پلیت حاوی دیسک اسید کلاولانیک، به‌عنوان سویه‌ی مولد ESBL تعیین گردید.

مطالعات مولکولی برای تأیید وجود ژن‌های ESBLs: به‌منظور استخراج DNA ژنومیک جهت انجام PCR از روش جوشاندن استفاده گردید. تکثیر ژن‌های موردمطالعه (bla_{TEM-1}، bla_{SHV-1}، bla_{SHV-5}، $bla_{CTX-M-1}$، $bla_{CTX-M-2}$، $bla_{CTX-M-3}$، $bla_{CTX-M-9}$، bla_{OXA-1}، bla_{GES-1} و bla_{GES-2}) با استفاده از جفت پرایمرهای تهیه شده ازشرکت سیناژن انجام گردید (جدول ۱). از مارکر ۱۰۰bp تهیه شده از شرکت Fermentase جهت تأیید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل ۱/۲ درصد آگاروز انجام شده، پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج با UV مشاهده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۰۰ ایزوله *پسودوموناس ائروژینوزا* از نمونه‌های مختلف شامل ۲۳ نمونه‌ی ادرار، ۱۸ نمونه‌ی تراشه، ۱۷ نمونه‌ی مدفوع، ۱۱ نمونه‌ی زخم، ۵ نمونه‌ی خون، ٤ نمونه‌ی ترشحات برونکوسکوپی، ۳ نمونه‌ی خلط، ۲ نمونه‌ی ترشحات واژن، ۱ نمونه‌ی ترشحات لوله گوارش، ۱ نمونه‌ی مایع جنب، ۱ نمونه‌ی چرک و ١٤ نمونه‌ی محیط مرطوب بیمارستان (دستشویی و محل دوش گرفتن) بود. در آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در آزمایشگاه، جنتامایسین بیشترین فعالیت ضد پسودوموناسی را در بین عوامل ضدمیکروبی مصرفی داشت (جدول ۲). بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین (٣٦ درصد) و کمترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین (١٦ درصد) بود. در روش Double-Disk-Diffusion از ۱۰۰ سویه‌ی *پسودوموناس ائروژینوزا*، ۸ سویه‌ی فتوتیپ بتالاکتاماز وسیع

Archive of SID

www.SID.ir

الطیف مثبت بودند که اکثر این سویه‌ها از نمونه‌های تراشه و ادرار جدا شده بودند. از ۸ سویه‌ی مولد ESBLs، ٤ سویه‌ی مقاوم به چند دارو (MDR) بودند و بیشترین مقاومت به پیپراسیلین دیده شد. از بین کل *پسودوموناس ائروژینوزا* مورد مطالعه در این پژوهش، ۷ درصد به همه آنتی‌بیوتیک‌های تست شده، حساس بودند و ۸ درصد تنها به یک عامل، به‌ویژه پیپراسیلین، مقاوم بودند. ۳۰ درصد سویه‌ها به‌عنوان MDR تعیین شدند. جدول ۳ الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۸ سویه پسودوموناس ائروژینوزای مولد ESBL جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیط مرطوب بیمارستان شهید بهشتی کاشان را نشان می‌دهد. از ۸ سویه‌ی ESBL مثبت، ۲ سویه با پرایمرهای مربوط به ژن bla_{SHV-1} و ژن bla_{SHV-5}، ۱ سویه با پرایمرهای مربوط به ژن $bla_{CTX-M-1}$ و ۸ سویه با پرایمرهای مربوط به ژن bla_{GES-2} باندهای اختصاصی دادند. سایر ژن‌ها در هیچ کدام از سویه ها شناسایی نشدند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه‌ی محصول (bp) ژن‌های ESBLs در این مطالعه

نوع ژن	پرایمر	توالی (´۳ to ´۵)	اندازه محصول(bp)	مرجع
TEM-1	TEM-1 A TEM-1 B	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATCA	۱۰۸۰	۵۲
SHV-1	SHV-1 A SHV-1 B	TGGTTATGCGTTATATTCGCC GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	۸٦۵	۵۲
SHV-5	SHV-5 A SHV-5 B	ACTGAATGAGGCGCTTCC CGCACCCCGCTTGCT	۲۲۰	۵۳
OXA-1	OXA-1 A OXA-1 B	AGCCGTTAAAATTAAGCCC CTTGATTGAAGGGTTGGGCG	۹۰۸	۵۲
CTX-M-1	CTX-M-1 A CTX-M-1 B	GCGATGTGCAGCACCAGTAA GGTTGAGGCTGGGTGAAGTA	٦۰۵	۵٤
CTX-M-2	CTX-M-2 A CTX-M-2 B	CGGAATTCATGATGACTCAGAGCAT TCG GCTCTAGATTATTGCATCAGAAACC GTG	٦۰۵	۱۷
CTX-M-3	CTX-M-3 A CTX-M-3 B	GGTTAAAAAATCACTGCG TTACAAACCGTCGGTGA	۸۷۳	۵۳
CTX-M-9	CTX-M-9 A CTX-M-9 B	TATTGGGAGTTTGAGATGGT TCCTTCAACTCAGCAAAAGT	۹۳۲	۵۲
GES-1	GES-1 A GES-1 B	ATGCGCTTCATTCACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	۸٦۰	۱۷
GES-2	GES-2 A GES-2 B	GTTTTGCAATGTGCTCAACG TGCCATAGCAATAGGCGTAG	۳۷۱	۵۰

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰۰ ایزوله پسودوموناس ائروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیط مرطوب بیمارستان شهید بهشتی کاشان

الگوی حساسیت و مقاومت / نوع آنتی‌بیوتیک	مقاوم درصد	حد واسط درصد	حساس درصد
پیپراسیلین (۱۰۰µg)	**۳۶**	**۰**	**۶۴**
سفوتاکسیم (۳۰µg)	**۲۹**	**۵۸**	**۱۳**
ایمی پنم (۱۰µg)	**۲۹**	**۲**	**۶۹**
سفتریاکسون (۳۰µg)	**۲۵**	**۱۳**	**۶۲**
جنتامایسین (۱۰µg)	**۲۳**	**۲**	**۷۵**
سفتازیدیم (۳۰µg)	**۲۱**	**۶**	**۷۳**
آزترونام (۳۰µg)	**۱۹**	**۱۱**	**۷۰**
سیپروفلوکساسین(۵µg)	**۱۶**	**۱۱**	**۷۳**

جدول ۳ : الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی ۸ ایزوله پسودوموناس ائروژینوزا مولد ESBL جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیط مرطوب بیمارستان شهید بهشتی کاشان

الگوی حساسیت و مقاومت / نوع آنتی‌بیوتیک	مقاوم تعداد	حد واسط تعداد	حساس تعداد
پیپراسیلین (۱۰۰µg)	۶	۰	۲
سفوتاکسیم (۳۰µg)	۵	۲	۱
سفتازیدیم (۳۰µg)	۵	۱	۲
سفتریاکسون (۳۰µg)	۵	۱	۲
ایمی پنم (۱۰µg)	۴	۰	۴
جنتامایسین (۱۰µg)	۴	۰	۴
آزترونام (۳۰µg)	۴	۱	۳
سیپروفلوکساسین (۵µg)	۱	۳	۴

بحث

نتایج الگوی حساسیت و مقاومت نشان داد که بیشترین مقاومت به پیپراسیلین، سفوتاکسیم و ایمی‌پنم نشان داده شد. بیشترین حساسیت به جنتامایسین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و آزترونام مشاهده گردید. در مطالعه‌ی انجام شده بر روی *پسودوموناس ائروژینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی در سال ۲۰۰۳ در ایران، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین وایمی‌پنم به‌ترتیب ۲۷/۱ و

Archive of SID

www.SID.ir

۶۷/۱ درصد، میزان مقاومت به پیپراسیلین در پژوهش انجام شده توسط جاویا و همکارانش در سال ۲۰۰۸، ۷۳/۲۱ درصد، میزان مقاومت به آزترونام در بررسی‌های انجام شده توسط منصور و همکارانش در پاکستان طی سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۴، ۳۰ درصد، همچنین درصد مقاومت به جنتامایسین در مطالعه انجام شده در نیجریه ۴۰/۲ درصد گزارش شد (۲۰-۱۷). در مطالعه‌ی حاضر فراوانی سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR)، ۳۰ درصد بود که این میزان کمتر از مقادیر گزارش شده در مطالعات دیگر در ایران، مالزی، پاکستان و نیز مطالعه انجام شده در همین بیمارستان در سال ۲۰۰۵ می‌باشد (۲۴-۲۱). در این بررسی، ۸ درصد سویه‌ها مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند که این میزان، بالاتر از مقادیر گزارش شده توسط وودفورد و همکاران در انگلیس (۳/۷ درصد)، لیم و همکاران در مالزی (۴/۲ درصد)، عزیز ژاپنی و همکاران در ایران (۴/۳ درصد) و جاکوسون و همکاران (۷/۷ درصد) می‌باشد (۲۶و ۲۵، ۲۱، ۱۷). در حالی که مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر در ایران، حاکی از افزایش درصد سویه‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف می‌باشد (۲۸ و ۲۷). نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در تایلند ۲۰/۶ درصد، در کره ۲۵/۴ درصد، در بولیوی ۲۳/۴ درصد، در هند ۲۰/۲۷ درصد، در شمال غربی پاکستان ۳۵/۸۵ درصد، مولد ESBLs می‌باشند که نسبت به مطالعه‌ی حاضر از فراوانی بیشتری برخوردار هستند (۳۰-۲۹، ۷،۲۴). در این مطالعه از بین ۸ سویه فنوتیپ مثبت، ۲ سویه دارای هر دو ژن bla_{SHV-1} و bla_{SHV-5}، ۱ سویه دارای ژن $bla_{CTX-M-1}$ و ۸ سویه دارای ژن bla_{GES-2} بودند و سایر ژن‌ها در هیچ کدام از سویه‌ها شناسایی نشدند، اما مطالعات انجام شده در دیگر مناطق ایران و سایر کشورها، نشان دهنده‌ی حضور این ژن‌ها در سویه‌های *پسودوموناس ائروژینوزا* می‌باشد (۳۲-۳۱، ۲۷، ۷). آنزیم‌های ESBLs نوع GES در *پسودوموناس ائروژینوزا* از بتالاکتامازهای اولیه در این گونه نمی‌باشند و اغلب آن‌ها در ترکیب با سفالوسپورینازهای اندوژن کروموزومی (AmpC type) و سایر آنزیم‌های اکتسابی نظیر OXA-types مشاهده می‌شوند (۳۳). ژن‌های bla_{GES} به‌عنوان بخشی از ساختمان‌های اینتگرون بر روی عناصر ژنتیکی متحرک، قابل انتقال می‌باشند که نه تنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف، بلکه در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌های غیروابسته نیز، مقاومت ایجاد می‌کنند و این امر باعث می‌شود که کنترل و درمان عفونت‌های ناشی از نمونه‌های مولد این آنزیم مشکل شود (۱۲). در این مطالعه، ژن bla_{GES-2} در همه نمونه‌های *پسودوموناس ائروژینوزا* مولد ESBLs شناسایی شد (هفت مورد از نمونه‌های بیماران بستری در بیمارستان و یک نمونه از محیط بیمارستان). تاکنون گزارشی مبنی بر شناسایی این ژن در *پسودوموناس ائروژینوزا* در نقاط دیگر ایران گزارش نشده است. اما برای اولین بار در مطالعات انجام شده توسط پورل و همکاران در سال ۲۰۰۰ میلادی از یک کشت خونی بیمار مبتلا به مالاریای مغزی و پنومونیای عفونی در بیمارستانی عمومی در جنوب آفریقا و سپس در سال ۲۰۰۴ میلادی توسط پاستران و همکاران در آرژانتین گزارش شده است و در پژوهش‌های متعدد، ویژگی‌های مولکولی و روش‌های دقیق شناسایی آن مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۷-۳۳، ۱۴). وجود این ژن باعث کاهش حساسیت به ایمی‌پنم می‌گردد. در این مطالعه نیمی از *پسودوموناس ائروژینوزا* مولد ESBLs که همگی دارای ژن bla_{GES-2} بوده مقاوم به ایمی‌پنم بودند. بیشترین مقاومت *پسودوموناس ائروژینوزا* مولد ESBLs به پیپراسیلین (۷۵ درصد)، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتریاکسون (۶۲/۵ درصد) مشاهده گردید و حساس‌ترین آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود. ESBLs آنزیم‌هایی هستند که توانایی غیرفعال کردن سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و مونوباکتام‌ها را دارند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف متنوعی در *پسودوموناس ائروژینوزا* گزارش شده و تیپ‌های جدید آن که شامل آنزیم‌های bla_{GES} می‌باشند، در

Archive of SID

www.SID.ir

حال ظهور هستند. بنابراین تشخیص آزمایشگاهی *پسودوموناس ائروژینوزا* مولد ESBLs مهم بوده زیرا این سویه‌ها به‌طور وسیعی مقاومت به سفتازیدیم و کاهش حساسیت به ایمی‌پنم را نشان داده که این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های *پسودوموناس ائروژینوزا* نقش مهمی را ایفا می‌کند.

نتیجه‌گیری

فشار انتخابی آنتی‌باکتریال ممکن است انتشار و تداوم ژن‌های bla_{GES} را در سویه‌های پاتوژن *پسودوموناس ائروژینوزا* بیمارستان ما تسهیل کند. برنامه‌های مراقبتی در سطوح استانی و ملی و غربالگری وقوع و شیوع ESBLs ممکن است در اجرای مناسب پروتکل‌های تجویز آنتی‌بیوتیکی مؤثر باشد و از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ظهور ژن‌های جدید مقاومت جلوگیری نماید.

References

1- Wirth FW, Picoli SU, Cantarelli VV, Gonçalves AL, Brust FR, Santos LM, Barreto MF. Metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2009; 13: 170-2.

2- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended spectrum β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; 35: 1697-704.

3- Rossolini GM, Mantegoli E. Treatment and control of severe infections caused by multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 17-32.

4- Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumanni* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis*. 2005; 18: 306-313.

5- 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: 131-5.

6- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18: 657-86.

7- Lee S, Park YJ, Kim M, et al. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 122-7.

8- Shah A, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gramnegative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Res Microbiol*. 2004; 155: 409-21.

9- Bonnet R. Growing group of extended spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004; 48: 1-14.

10- Gupta V. An update on newer β-lactamases. *Indian J Med Res*. 2007; 126: 417-27.

11- Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. Extended-spectrum β-lactamases: Implication for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med*. 2008; 28: 401-12.

Archive of SID

www.SID.ir

12- Weldhagen GF. GES: an emerging family of extended spectrum beta lactamases. *Clin Microbiol Newsl*. 2006; 28: 145-9.

13- Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 622-32

14- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a Class A β Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 2598-603.

15- Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57: 1261-2.

16- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing: Document M10.-S16.Vol.26 No.3 CLSI, Wayne, PA, USA, 2006.

17- Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the south of Iran. *Burns*. 2006; 32: 343-7.

18- Javiya VA, Ghatak SB, Patel KR, Patel JA. Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care hospital in Gujarat, India. *Indian J Pharmacol*. 2008; 40: 230-4.

19- Mansoor T, Musani MA, Khalid G, Kamal M. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic suppurative otitis media: sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2009; 21: 120-3.

20- Fadeyi A, Akanbi AA 2nd, Nwabuisi C, Onile BA. Antibiotic disc sensitivity pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from clinical specimens in Ilorin, Nigeria. *Afr J Med Med Sci*. 2005; 34: 303-6.

21- Lim KT, Yasin RM, Yeo CC, et al. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009; 42: 197-209.

22- Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*. 2010; 36: 70-4.

23- Moniri R, Mosayebi Z, Movahedian AH, Mossavi GhA. Increasing Trend of Antimicrobial Drug-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Causing Septicemia. *Iranian J Pub Health* .2006; 35: 58-62.

24- Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the North West of Pakistan. *Burns*. 2009; 35: 1020-5.

25- Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum β-lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62: 1265-8.

26- Jacobson KL, Cohen SH, Inciardi JF, et al. The relationship between antecedent antibiotic use and

Archive of SID

www.SID.ir

resistance to extended spectrum cephalosporins in Group I β-lactamase producing organisms. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 1107-13.

27- Shakibaie M, Shahcheraghi F, Hashemi A, Saeed Adeli N. Detection of TEM, SHV and PER Type extended-spectrum β-lactamas gene among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Burnt Patients at Shafa-Haspital, Kerman, Iran. *Iranian J Basic Med Sci*. 2008; 11: 104-11.

28- Imani Foolad AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods. *J Ardabil Univ Medi Sci*. 2010; 10: 189-98.

29- Chayakulkeeree M, Junsriwong P, Keerasuntonpong A, Tribuddharat C, Thamlikitkul V. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacilli at Siriraj Hospital, Thailand, 2003. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36: 1503-9.

30- Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 β-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57: 975-8.

31- Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 3908-13.

32- Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs Genes Among Multidrug-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients in Tehran. *Microbial Drug Resistance*. 2009; 15: 37-39.

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

34- Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49: 561-5.

35- Weldhagen GF. Rapid detection and sequence-specific differentiation of extended-spectrum β-lactamase GES-2 from *Pseudomonas aeruginosa* by use of a real-time PCR assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 4059-62.

36- Weldhagen GF, Prinsloo A. Molecular detection of GES-2 extended spectrum Beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24: 35-8.

37- Pasteran F. Dissemination of GES extended-spectrum β-lactamaseproducing *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in Argentina. [abstract]. 44th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. 2004. C2-1327.

Archive of SID

www.SID.ir

Detection of the bla Genes (TEM-1, SHV-1, SHV-5, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, OXA-1, GES-1 and GES-2) in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical and Environmental Samples of Shahid Beheshti Hospital in Kashan

Tavajjohi Z[1], Moniri R[2], Khorshidi A[3], Rohani M[4]

[1]Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

[2]Dept. of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Anatomical Sciences Research Center, Kashan, Iran

[3]Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

[4]Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Moniri R, Dept. of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan Anatomical Sciences Research Center, Kashan, Iran.

E-mail: moniri@kaums.ac.ir

Received: 15 Mar 2012 **Accepted:** 9 Jul 2012

Background and Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is the most common pathogen causing nosocomial infections. The aim of this study was to determine the antimicrobial susceptibility pattern and prevalence of ESBLs in clinical and environmental isolates of *P. aeruginosa* by phenotypic and genotypic techniques.

Materials and Methods: In this descriptive study, a total of 100 *P. aeruginosa* strains isolated from different clinical and environmental specimens were used. The antibiotic resistance pattern to eight antimicrobial agents was determined by disk diffusion method. The ESBLs producing strains were confirmed by double-disk-diffusion test, and the bla_{TEM-1}, bla_{SHV-1}, bla_{SHV-5}, $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-9}$, bla_{OXA-1}, bla_{GES-1}, and bla_{GES-2} genes were detected by PCR.

Results: Piperacillin and ciprofloxacin showed the highest (36%) and the lowest (16%) resistance against the isolates, respectively. Thirty percent of the total isolates were resistant to at least three classes of antibiotics. By double-disk-diffusion test, eight strains (8%) were ESBL positive. According to the PCR results, the bla_{GES-2}, bla_{SHV-1}, bla_{SHV-5}, and $bla_{CTX-M-1}$ genes were detected in 8, 2, 2, and 1 isolates of ESBLs producing strains respectively.

Conclusion: The bla_{GES-2} gene displayed an expanded hydrolysis profile to the antibiotic imipenem. In fact, this enzyme, which plays an important role in resistance to imipenem, was detected in all ESBLs producing *P. aeruginosa* strains. This is the first report describing bla_{GES-2} producing *P. aeruginosa* in Iran.

Keywords: ESBL, gene, Molecular detection, Multidrug resistant, Pseudomonas aeruginosa

Archive of SID

www.SID.ir