بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و ردیابی بتالاکتاماز طیف وسیع تیپ CTX-M در جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا در شهر مشهد

محبوبه نخعی مقدم*[1]، مریم حسینی حسن آبادی[1]، هایده مبین[2]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ایران

۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/٤ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۱

چکیده

مقدمه: بتالاکتامازهای طیف وسیع(ESBL) باعث مقاومت برخی از باکتری ها به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شوند. هدف از مطالعه حاضر بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا در مشهد و ردیابی ESBL تیپ CTX-M در میان آن ها بود.

مواد و روش ها: در این تحقیق باکتری های سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های مختلف(زخم، ادرار، گوش، ریه، مایع صفاق و سایر مایعات بدن) بیماران بستری در شهر مشهد و سال ۱۳۹۲ جمع آوری شدند. سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار در آگار بر اساس استانداردهای کربای بایر انجام شد و فراوانی سویه های مولد ESBL با روش دیسک ترکیبی بررسی گردید. بعد از استخراج DNA پلاسمیدی حضور ژن bla_{CTX-M} با روش واکنش زنجیره پلیم راز و با استفاده از پرایمر اختصاصی ردیابی شد.

یافته های پژوهش: تمامی باکتری های جدا شده مقاوم به سفتیزوکسیم، سفوکسیتین و اکساسیلین بودند. مقاومت به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، ایمی پنم، پیپراسیلین و کوتریموکسازول به ترتیب ۴۵/۳۱ درصد، ۴۸/۴۴ درصد، ۴۵/۳۱ درصد، ۴۳/۷۵ درصد و ۹۸/۴۴ درصد بود. درصد زیادی از جدایه های مولد ESBL در مقایسه با انواع غیر مولد ESBL، نسبت به کوتریموکسازول، جنتامایسین و پیپراسیلین مقاوم بودند که اختلاف برای جنتامایسین معنی دار بود. از ۶۴ باکتری جدا شده ۸ جدایه(۱۲/۵ درصد) مولد بتالاکتاماز طیف وسیع بودند و هیچ کدام از آن ها بتالاکتاماز نوع CTX-M نداشتند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج تحقیق نشان داد که اگر چه مقاومت جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در جامعه مورد بررسی زیاد است، اما این مقاومت ناشی از شیوع ژن bla_{CTX-M} در میان جدایه ها نبود و مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند به انواع دیگری از بتالاکتامازها وابسته باشد.

واژه های کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، سودوموناس آئروجینوزا، بتالاکتاماز طیف وسیع، تیپ CTX-M

* **نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ایران

Email: mahboobe_nak@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا یک عامل بیماری زای فرصت طلب با مقاومت ذاتی نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک هاست که در دهه های اخیر به عنوان عامل مولد انواعی از عفونت های جدی در بیماران بستری، به ویژه افراد با نقص سیستم ایمنی شناسایی می شود،(۱). سودوموناس آئروجینوزا عامل حدود ۱۰ درصد عفونت های بیمارستانی شایع به حساب می آید،(۲). مقاومت های آنتی بیوتیکی در این باکتری می تواند مربوط به مقاومت های اکتسابی ناشی از انتقال پلاسمیدی باشد،(۱). یکی از مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری تولید بتالاکتامازهاست که این آنزیم ها می توانند بسیاری از آنتی بیوتیک های بتالاکتام(مانند پنی سیلین، سفالوسپورین و کارباپنم) را غیر فعال سازند،(۳). این آنزیم ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی در آنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن ها می شوند. پیدایش آنتی بیوتیک های جدید از قبیل سفالوسپورین های طیف وسیع و رواج استفاده از آن ها در درمان عفونت ها باعث پیدایش دسته جدیدی از این آنزیم ها به نام بتالاکتامازهای طیف وسیع(ESBL) شده است،(۴). بتالاکتامازهای طیف وسیع، آنزیم های بتالاکتامازی هستند که اکسی ایمینوسفالوسپورین ها(سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم) را هیدرولیز می نمایند و توسط مهارکننده های بتالاکتامازی مهار می شوند. طی سال های گذشته، شیوع سویه های مولد بتالاکتامازهای طیف وسیع که اکسی ایمینوسفالوسپورین ها را هیدرولیز می نمایند، در بین جدایه های بالینی رو به افزایش بوده و منجر به محدودیت درمان های دارویی شده است. احتمال دارد فشار انتخابی استفاده زیاد از آنتی بیوتیک های جدید در درمان عفونت ها، ظهور انواع جدید بتالاکتاماز را به همراه داشته است،(۵،۶). در حال حاضر بتالاکتامازها به چهار رده A، B، C و D تقسیم بندی می شوند،(۷). بتالاکتامازهای رده A و C معمول ترین انواع هستند و مشابه گروه D دارای اسید آمینه سرین در سایت فعال خود می باشند، گروه B شامل متالوبتالاکتامازهاست. بتالاکتامازهای تیپ CTX-M متعلق به دسته A هستند که فعالیت هیدرولیزی آن در برابر سفوتاکسیم بیشتر از سفتازیدیم است،(۸). CTX-M-1 اولین واریانتی بود که از سویه های اشریشیاکلی در آلمان شناسایی شد. ژن های کدکننده CTX-M اغلب روی پلاسمید قرار گرفته اند،(۹). متالوبتالاکتامازهای رده B (مثل IMP و VIM) و رده A به ویژه آنزیم های VEB، PER و GES در باکتری های سودوموناس آئروجینوزا مهم هستند،(۶،۱۰). هر چند یک جدایه مولد CTX-M-1 از هلند،(۱۱)، و هم چنین جدایه های مولد CTX-M-2 و CTX-M-43 در بولیوی گزارش شده اند،(۱۲). در تحقیق انجام شده بر روی ۴۳ باکتری سودوموناس آئروجینوزای مقاوم به سفتازیدیم جدا شده از عفونت های خونی بیماران بستری در بیمارستان برزیل در سال ۲۰۰۵ مشخص شد که ۹ جدایه(۲۰/۹ درصد) آنزیم نوع GES-1 (۷ جدایه، ۱۶/۳ درصد) و یا CTX-M-2 (۲ باکتری، ۴/۶ درصد) تولید می کنند.(۱۰)

به این دلیل که سودوموناس آئروجینوزا یکی از عوامل عفونی شایعی است که از نمونه های بالینی در بیمارستان های مشهد به وفور جدا می شود و اطلاع کافی از ژن های مولد بتالاکتاماز این باکتری در بیمارستان های مشهد وجود ندارد، در تحقیق حاضر تلاش بر بررسی مقاومت های آنتی بیوتیکی جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا و ردیابی سویه های مولد بتالاکتامازهای طیف وسیع تیپ CTX-M در میان آن ها با استفاده از واکنش زنجیره پلی مراز(PCR) بود.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری ها: باکتری های سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های بالینی مختلف شامل نمونه های زخم، ادرار، گوش، ریه، مایع صفاق، مایع مفصل و مایع پلور از بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان های مشهد در اوایل سال ۱۳۹۲ جدا شدند. نمونه های تکراری حذف شدند. باکتری ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم، مورفولوژی کلنی و آزمایشات بیوشیمیایی شامل آزمایش های اکسیداز، عدم تخمیر قند در TSI آگار، حرکت، کشت در ستریماید آگار و رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد شناسایی شدند.

حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده و شناسایی فنوتیپی باکتری های مولد ESBL: حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و غیربتالاکتام با روش کربای بایر مطابق با دستورات موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی(CLSI) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از سوسپانسیون باکتریایی ۱۸ تا ۲۰ ساعته با کدورت معادل نیم مک فارلند($۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی لیتر) استفاده شد که با

Archive of SID

www.SID.ir

روش کشت یکنواخت بر روی محیط مولرهینتون آگار تلقیح شد. دیسک های آنتی بیوتیکی استاندارد از شرکت MAST انگلستان با فواصل استاندارد بر روی محیط قرار گرفتند. پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار گرفتند،(۱۳). از اشریشیاکلی ATTC 25922 به عنوان سویه کنترل استفاده شد. دیسک ها عبارت بودند از ایمی پنم(۱۰µg)، سفوکسیتین(۳۰µg)، سفتیزوکسیم(۳۰µg)، اکساسیلین(۱µg)، سیپروفلوکساسین(۵µg)، جنتامایسین(۱۰µg) و کوتریموکسازول(۲۵µg).

برای تعیین باکتری های مولد بتالاکتاماز از آزمایش تاییدی CLSI استفاده شد. بدین منظور پس از تهیه کشت خالص و یکنواخت بر روی محیط مولر هینتون آگار، دیسک های سفتازیدیم(۳۰ میکروگرم) و سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید(۱۰/۳۰ میکروگرم) با فاصله ۱۵ میلی متر روی سطح محیط قرار داده شدند. پلیت ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوازی به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار داده شدند. چنان چه افزایشی به مقدار ۵ میلی متر یا بیشتر در اندازه قطر هاله عدم رشد دیسک سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید نسبت به دیسک سفتازیدیم تنها دیده شد، باکتری به عنوان باکتری مولد ESBL در نظر گرفته شد.(۱۴،۱۵)

استخراج DNA پلاسمیدی باکتری های سودوموناس آئروجینوزای مولد ESBL: یک یا دو کلنی خالص از باکتری های تازه کشت شده به ۳ میلی لیتر از محیط لوریا برتانی(LB) حاوی ۱۰۰µg آمپی سیلین در شرایط استریل تلقیح شد. لوله ها بعد از تلقیح باکتری در گرمخانه شیکردار ۳۷ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۸۵ به مدت ۱۷ تا ۱۸ ساعت قرار داده شدند. پلاسمید باکتری ها با استفاده از کیت شرکت سینا کلون(50 Preps) مطابق دستور شرکت استخراج شد. DNA استخراج شده بر روی ژل ۱/۵ درصد به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه و ولتاژ ۹۰ الکتروفورز گردید. وجود باندها با استفاده از رنگ آمیزی با Green viewer و دستگاه Gel document مورد بررسی قرار گرفت.

ردیابی ژن bla_{CTX-M} با استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلی مراز(PCR): برای ردیابی ژن bla_{CTX-M} از پرایمر اختصاصی CTX-MU (CTX-MU1: 5'- ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT-3' وCTX-MU2: 5'- TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA-3) استفاده شد،(۱۶). شرایط انجام PCR پس از بهینه شدن به شرح زیر بود:

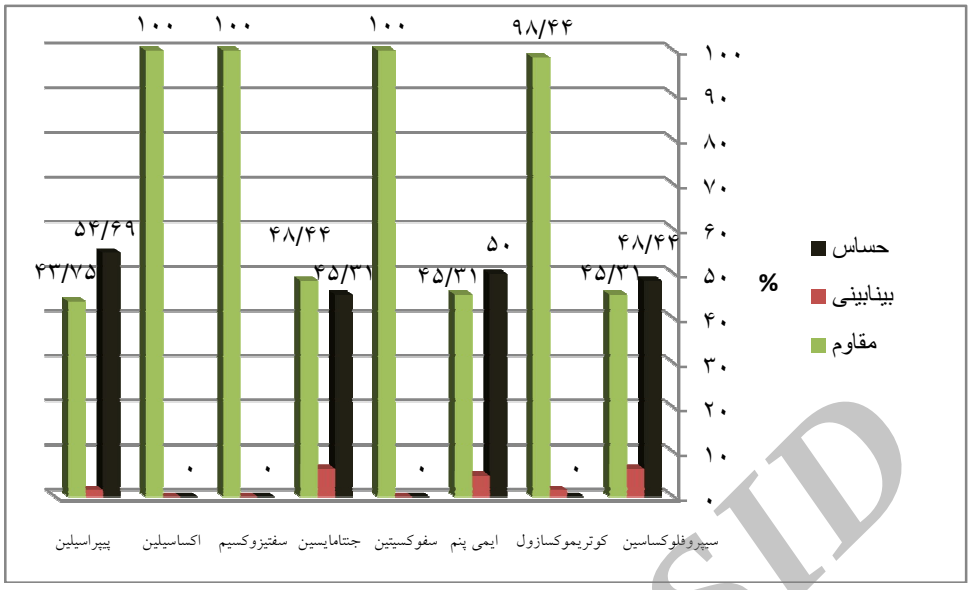
مرحله شروع(۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه)، ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت(۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه)، اتصال(۵۲ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه) و طویل شدن(۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه) و مرحله طویل شدن نهایی(۷۲ درجه سانتی گراد، ۵ دقیقه). مخلوط واکنش با حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۲ µl از DNA پلاسمیدی(۸۰-۵۰ نانوگرم)، ۳ µl بافر(۱۰X) PCR ، ۱ µl از پرایمرها با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۰/۵ µl مخلوط dNTP با غلظت ۱۰ پیکومول، ۱ µl از $MgCl_2$ با غلظت ۵۰mM و ۰/۲۵ µl آنزیم Taq DNA پلی مراز(۵u/µl) بود. برای اطمینان از تکثیر DNA باکتریایی که طول آن ۵۳۹ جفت باز(bp) بود، محصولات PCR در کنار نشانگر ۱۰۰ bp (Fermentas- Lativa) بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS vol.16 استفاده شد. حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها بر اساس میانگین قطر هاله عدم رشد پس از سه بار تکرار و به صورت درصد مشخص گردید. برای مقایسه مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام بین دو گروه باکتری های مولد ESBL و فاقد ESBL از آزمون کای اسکوئر استفاده شد و P کم تر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

در مجموع ۶۴ باکتری سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های بالینی مختلف از بیماران بستری در بیمارستان های مشهد جمع آوری شد. تمامی باکتری های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های سفتیزوکسیم، سفوکسیتین و اکساسیلین مقاوم بودند. نمودار شماره ۱ الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها را نسبت به آنتی بیوتیک های مورد آزمایش نشان می دهد. همان طوری که در نمودار مشخص است میزان مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های مورد آزمایش زیاد است. بیشترین میزان حساسیت نسبت به پیپراسیلین(۵۴/۶۹ درصد) و سپس به ایمی پنم(۵۰ درصد) بود.(نمودار شماره ۱)

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار شماره ۱ . الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های سودوموناس آئروجینوزا در مشهد

بر اساس آزمایش فنوتیپی از میان ۶۴ باکتری جدا شده، ۸ جدایه(۱۲/۵ درصد) دارای بتالاکتاماز طیف وسیع بودند. جدول شماره ۱ میزان حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی را بین جدایه های مولد ESBL و فاقد ESBL مقایسه می کند. همان طوری که پیش از این گفته شد، تمامی جدایه های $ESBL^+$ و $ESBL^-$ نسبت به سه آنتی بیوتیک سفتیزوکسیم، سفوکسیتین و اکساسیلین مقاوم بودند. میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، کوتریموکسازول در میان باکتری های مولد ESBL بیشتر از انواع فاقد ESBL بود که اختلاف برای جنتامایسین معنی دار بود.($P<0.05$)

جدول شماره ۱ . مقایسه حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های سودوموناس آئروجینوزای مولد ESBL(n=۸) و فاقد ESBL(n=۵۶)

آنتی بیوتیک	$ESBL^+$ تعداد(درصد)			$ESBL^-$ تعداد(درصد)		
	حساس	بینابینی	مقاوم	حساس	بینابینی	مقاوم
سیپروفلوکساسین	۲ (۲۵)	۲ (۲۵)	۴ (۵۰)	۲۹ (۵۱/۷۹)	۲ (۳/۵۷)	۲۵ (۴۴/۶۴)
جنتامایسین	۱ (۱۲/۵)	۰	۷ (۸۷/۵)	۲۸ (۵۰)	۴ (۷/۱۴)	۲۴ (۴۲/۸۶)
کوتریموکسازول	۰	۰	۸ (۱۰۰)	۰	۱ (۱/۷۹)	۵۵ (۹۸/۲۱)
ایمی پنم	۴ (۵۰)	۲ (۲۵)	۲ (۲۵)	۲۸ (۵۰)	۱ (۱/۷۹)	۲۷ (۴۸/۲۱)

پس از تعیین جدایه های مولد ESBL، DNA پلاسمیدی آن ها استخراج شد. آزمایش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی و باکتری کنترل مثبت نشان داد که باکتری های جدا شده فاقد بتالاکتامازهای طیف وسیع از نوع CTX-M هستند.(شکل شماره ۱)

Archive of SID
www.SID.ir

شکل شماره ۱ . الکتروفورز محصولات PCR ژن bla_{CTX-M} بر روی ژل آگارز در کنار مارکر استاندارد ۱۰۰ جفت بازی، راست: کنترل منفی و کنترل مثبت، بقیه نمونه ها هستند که برای آن ها باندی مشاهده نمی شود.

بحث و نتیجه گیری

پیدایش آنزیم های بتالاکتاماز در میان باکتری ها باعث پدیده مقاومت در بسیاری از باکتری های مسبب عفونت های بیمارستانی شده و در نتیجه درمان عفونت های حاصل از آن ها را با مشکلات جدی رو به رو ساخته است.(۱۷)

در مطالعه حاضر از مجموع ۶۴ باکتری سودوموناس جدا شده، ۸ باکتری(۱۲/۵ درصد) مولد ESBL بودند که هیچ کدام ژن bla_{CTX-M} را نداشتند. تمامی باکتری های جدا شده نسبت به سفوکسیتین، سفتیزوکسیم و اکساسیلین مقاوم بودند و میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، ایمی پنم، پیپراسیلین و کوتریموکسازول به ترتیب ۴۵/۳۱ درصد، ۴۸/۴۴ درصد، ۴۵/۳۱ درصد، ۴۳/۷۵ درصد و ۹۸/۴۴ درصد بود. درصد بیشتری از باکتری های مولد ESBL در مقایسه با انواع غیر مولد ESBL، مقاوم به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، کوتریموکسازول و پیپراسیلین بودند که اختلاف برای جنتامایسین معنی دار بود. این احتمال هست که ژن مقاومت به این آنتی بیوتیک همراه با ژن ESBL منتقل شود. به دنبال جستجویی که در مقالات و منابع موجود انجام گرفت گزارش هایی مبنی بر ردیابی ژن bla_{CTX-M} در میان جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا مشاهده شد. در مطالعه ای(۱۳۸۸) بر روی ۱۲۰ جدایه بالینی سودوموناس آئروجینوزا از بیماران بستری بخش سوختگی در بیمارستان کرمان، ۴۱ جدایه(۳۴/۲ درصد) مولد ESBL و یک سویه دارای ژن bla_{CTX-M} بود،(۱۸). در مطالعه ای دیگر که در سال ۱۳۹۱ بر روی بیماران بستری در بیمارستان های کرمان انجام شده است، از ۹۳ باکتری سودوموناس آئروجینوزای جدا شده، ۵۹/۴ درصد مولد ESBL بودند و در میان آن ها یک سویه حامل ژن bla_{CTX-M} بود. مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۳۶/۶ درصد و ۳۶/۴ درصد بود،(۱۹). شیوع بتالاکتامازهای طیف وسیع در جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا در کرمان بیشتر از مطالعه حاضر بوده است. در پژوهشی(۱۳۹۰) که ۱۵۰ باکتری سودوموناس آئروجینوزا از بیماران بستری با عفونت ادراری در بیمارستان امیرالمومنین شهر زابل جدا شد، ۲۰ جدایه(۱۳/۳ درصد) حامل بتالاکتاماز طیف وسیع بودند و مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و کوتریموکسازول به ترتیب ۲۵ درصد، ۱۵ درصد و ۶۵ درصد بود. تمامی جدایه ها فاقد ژن bla_{CTX-M} بودند،(۲۰). در مطالعه ای دیگر که در سال ۱۳۸۹ از بیمارستان شهید بهشتی کاشان گزارش شده است، از ۱۰۰ باکتری سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از نمونه های مختلف بالینی و محیطی، ۸ جدایه(۸ درصد) مولد بتالاکتاماز بودند و یک سویه دارای ژن bla_{CTX-M} بود که در میان آن ها میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۲۳ درصد و ۱۶ درصد بود،(۲۱). در تحقیقی دیگر در سال ۱۳۹۰ بر روی ۸۶ جدایه سودوموناس آئروجینوزا در بیمارستان بهشتی شهرستان کاشان انجام گرفت، ۸/۱ درصد باکتری ها دارای ESBL بودند و یک جدایه حامل ژن bla_{CTX-M} بود. ۲۴/۴ درصد و ۱۷/۴ درصد باکتری های جدا شده نسبت به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند،(۲۲). در تحقیقی از بیماران دو بیمارستان در تهران(۱۳۸۸)، مقاومت نسبت به پیپراسیلین، جنتامایسین، ایمی پنم و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۴۶ درصد، ۳۱ درصد، ۱۹/۵ درصد و ۶ درصد گزارش شده است. به نظر می رسد میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزای مشهد بیشتر از گزارش های سایر شهرهاست و یا میزان مقاومت در این باکتری رو به افزایش است.(۲۳)

در مطالعه ای(۲۰۰۵) که بر روی ۲۵۲ جدایه بالینی سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از ۱۲ بیمارستان و یک آزمایشگاه در کره انجام شد، هیچ یک از آن ها دارای ژن

Archive of SID

www.SID.ir

bla_{CTX-M} نبودند،(۲۴). در تحقیقی دیگر(۲۰۰۵) بر روی ۴۳ جدایه بالینی سودوموناس آئروجینوزا از بیماران با عفونت خونی در بیمارستان برزیل انجام شد، ۹ باکتری(۲۰/۹ درصد) دارای ESBL و ۲ جدایه حامل ژن bla_{CTX-M} بودند،(۱۰). از ۵۰ باسیل گرم منفی غیرتخمیری گزارش شده از بیمارستانی در هند(۲۰۰۸)، ژن bla_{CTX-M} در ۱ باکتری(۲ درصد) ردیابی شد،(۲۵). مقایسه مطالعه حاضر با سایر مطالعات نشان می دهد که بتالاکتامازهای طیف وسیع در میان جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزای مشهد، در مقایسه با میزان گزارش شده از کرمان کمتر و در مقایسه با کاشان بیشتر است.

نتایج تحقیق، زیاد بودن مقاومت های آنتی بیوتیکی را در میان جدایه های سودوموناس آئروجینوزا در ناحیه مورد بررسی و تولید بتالاکتامازهای طیف وسیع را در برخی از آن ها تایید نمود. در حالی که ژن تولید بتالاکتاماز CTX-M در هیچ یک از آن ها ردیابی نشد. با توجه به گزارشات سایر تحقیق ها در مجموع به نظر می رسد شیوع ژن bla_{CTX-M} در میان باکتری های سودوموناس آئروجینوزا کم است.

عدم ردیابی ژن bla_{CTX-M} در میان باکتری های مورد بررسی و زیاد بودن مقاومت های آنتی بیوتیکی در میان آن ها نشان می دهد که مقاومت در این جدایه ها بیشتر ناشی از ژن های دیگر ESBL و یا سایر مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی است که نیاز به تحقیقات بیشتر در رابطه با ردیابی سایر ژن های ESBL در این ناحیه دارد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شده است که بدین وسیله از مسئولین محترم این دانشگاه تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Shahid M, Malik A, Sheeb A. Multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa strains harboring R-plasmids and Amp C β-lact-amases isolated from hospitalized burn patients in tertiary care hospital of North India. FEMS Microbiol Lett 2003; 228:181-6.
2. Smith S, Ganiyu O, John R, Fowora M, Akinsindle K, Oeigah P. Antimicrobial resist-ance and molecular typing of Pseudomonas aeruginosa isolated from surgical wounds in Lagos, Nigeria. Act Med Iran 2012; 50:433- 8.
3. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 7th ed. Goldberger, Elsevier Mosby; 2012.
4. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for Escherichia coli with isolates collected during Project ICARE. J Clin Microbiol 2003; 41: 3142-46.
5. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum beta-lactamases in urinary isolates of Escerichia coli and Klebsiella pneumoniae-Prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. Indian J Med Microb 2004; 22: 172-4.
6. AL- Jasser AM. Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. Kuwait Med J 2006; 38: 171-85.
7. Sridar Rao PN. Extended spectrum beta-lactamase. JJMC 2010; 5:1-32.
8. George AJ. The New beta- lactamases. N Engl J Med 2005; 352: 380-91.
9. Bonnet R. Growing group of extended spectrum beta- lactamases: the CTX-M enz-ymes. Anti Microbial Agent Chemo 2004; 48: 1-44.
10. Picao 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.
11. Naiemi Al, Duim NB, Bart A. A CTX-M extended-spectrum β-lactamase in Pseud-omonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia. J Med Microbiol 2006; 55: 1607-8.
12. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of bla_{CTX-M}-type and bla_{PER-2} β-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 975-8.

Archive of SID
www.SID.ir

13. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 12th informational supplement. M100-S12, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne: Pa; 2002.
14. Philippon A, Arlet B, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1-11.
15. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa using PCR–restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 11-18.
16. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, et al. Multiple CTX-M- type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. J Clin Microbiol 2003; 41: 426-9.
17. Paterson LD. Resistance in Gram negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Med 2006; 119: 20-8.
18. Shahcheraghi F, Shakibaie M, Noveiri H. Molecular identification of ESBL genes bla_{GES-1}, bla_{VEB-1}, bla_{OXA-4}, bla_{OXA-10} and bla_{PER-1} in P. aeruginosa strains isolated from burn patients by PCR, RFLP and sequencing techniques. Int J Biol Life Sci 2010; 6; 3: 138-42.
19. Mansouri S, Razavi M, Norouzi F, Najar S. [Prevalence of beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of multidrug resistant clinical isolates of non-fermenting Gram negative bacteria from hospitalized patients in Kerman, Iran]. Jundishapur J Microbiol 2012; 5: 405-10. (Persian)
20. Saeidi S, Alavi-Naini R, Shayan S. [Antimicrobial susceptibility and distribution of TEM and CTX-M genes among ESBL- producing Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa causing urinary tract infections]. Zahedan J Res Med Sci 2013; 15:10-4. (Persian)
21. Tavajohi Z, Moniri R, Khorshidi R, Rohani M. 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. Zahedan J Res Med Sci 2012; 20: 42-51.
22. Tavajohi Z, Moniri R, Khorshidi A. Detection and characterization of multidrug resistance and extended-spectrum-beta-lactamase- producing (ESBLs) P. aeruginosa isolates in teaching hospital. Afr J of Microbiol Res 2011; 5: 3223-8.
23. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in Tehran. Microb Drug Resist 2009; 15: 37-9.
24. Lee S, Park YJ, Lee HK, Han K, Kang MW. Prevalence of Ambler A and D beta-lactamases among clinical isolates of P. aeruginosa in Korea. J Antimicrob Chemother 2005; 56:122-7.
25. Jemima SA, Verghese S. Multiplex PCR for bla_{CTX-M} and bla_{SHV} in the expended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Gram negative isolates. Indian J Med Res 2008; 128: 313-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Antibiotic Resistance and Detection of CTX-M Type Extended Spectrum Beta-lactamase in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa in Mashhad

*Nakhaei Moghaddam M[1] *, Hosseini Hasanabady M[2], Mobaiyen H[3]*

(Recived: 24January, 2014 Accepted: 1 June, 2014)

Abstract

Introduction: Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) make some bacteria resistance to broad spectrum beta-lactam antibiotics. The aim of the present study was to evaluate the antibiotic resistance of clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Mashhad and detect CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase among them.

Materials & Methods: Clinical isolates of P. aeruginosa were collected from different samples (wound, urine, ear, lung, peritoneal fluid and other body fluids) of hospitalized patients in Mashhad in 2013. The antibiotic susceptibility was examined by disc diffusion method and Kirby-Bauer standards. The frequency of ESBL producing strains was determined via the combined disk method. After plasmid DNA extraction, the existence of bla_{CTX-M} gene was detected by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers.

Findings: All isolated bacteria were resistant to ceftizoxime, cefoxitin and oxacillin. Resistance to ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, piperacillin and co- trimoxazole was 45.31%, 48.44%, 45.31%, 43.75 and 98.44%, respectively. A large percentage of ESBL-producing isolates were resistant to co-trimoxazole, gentamicin, and piperacillin compared to ESBL-non producers and the difference for gentamicin was significant. Out of 64 clinical isolated bacteria, 8 (12.5%) isolates were beta- lactamase producers and none ~~of them~~ were positive for bla_{CTX-M} type ESBL.

Discussion & Conclusions: Results of this study showed that although the sample population showed a high resistance to clinical isolates of P. aeruginosa rather than beta-lactam antibiotics, this resistance was not due to the prevalence of bla_{CTX-M} gene among isolated strains and antibiotic resistance could be dependent on other types of beta-lactamases.

Key words: Antibiotic resistance, Pseudomonas aeruginosa, extended spectrum beta-lactamase, CTX-M type

1.Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2.Dept of Microbiology, Faculty of Basic Sciences,Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
** Correspondin author*

Archive of SID

www.SID.ir