

## شناسایی ژن‌های *bla<sub>SHV</sub>*، *CTX-M* و *TEM* در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای جداشده از نمونه‌های انسانی و دامی به روش Multiplex-PCR

فرزانه فرضعلی شیره جینی<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۱\*</sup>، حسین فتاحی<sup>۲</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** پseudomonas آئروژینوزا، یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت‌های فرصت طلب می‌باشد. عفونت ایجاد شده به وسیله پseudomonas آئروژینوزا، اغلب شدید و تهدید کننده بوده و درمان آن به دلیل حساسیت محدود به عوامل آنتی‌بیوتیکی و کسب مقاومت در حین درمان، مشکل است. مطالعه حاضر با هدف شناسایی ژن‌های *bla<sub>SHV</sub>*، *CTX-M* و *TEM* در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای جداشده از نمونه‌های انسانی و دامی به روش Multiplex-PCR انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی - مقطعی، در مجموع تعداد ۱۲۰ جدایه پseudomonas آئروژینوزا از نمونه‌های انسانی و شیرخام حیوانات به دست آمد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی طبق دستورالعمل CLSI و براساس روش انتشار در ژل تعیین گردید. DNA سلولی با استفاده از کیت DNA-سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF)، استخراج و PCR چندگانه به منظور شناسایی ژن‌های *CTX-M*، *SHV* و *TEM* انجام شد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه، بیشترین میزان مقاومت در بین نمونه‌های انسانی و دامی برای آموکسی‌سیلین، آمیکاسین (۱۰۰٪) و کمترین میزان مقاومت نسبت به سپیروفلوکساسین با فراوانی ۹۰٪ در بین نمونه‌های انسانی و ۹۳/۴٪ در بین نمونه‌های دامی مشاهده گردید. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی طبق دستورالعمل CLSI و براساس روش انتشار در ژل تعیین شد. طبق نتایج CDT، ۷۳ (۶۰/۸٪) ایزوله، فنوتیپ ESBLs را از خود نشان دادند و براساس نتایج M-PCR؛ ۲۶ (۲۱/۶٪) و ۴۱ (۳۴/۲٪) سویه، حاوی ژن *CTX-M* و *TEM* بودند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا، مقاومت بالایی دارند. همچنین فراوانی این ژن‌ها در بین ایزوله‌های دامی و انسانی بالا می‌باشد، در نتیجه کنترل این باکتری‌ها هم در انسان و هم دام، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

**کلید واژه‌ها:** پseudomonas آئروژینوزا؛ بتالاکتاماز؛ حساسیت آنتی‌بیوتیکی؛ حساسیت دارویی.

<sup>۱</sup>گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

<sup>۲</sup>گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

کیومرث امینی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:  
dr\_kumarss\_aminii@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۴

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Farzali Shirehjini F, Amini K, Fatahi H. Identification of *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, and *bla<sub>TEM</sub>* genes in pseudomonas aeruginosa strains isolated from human and animal samples using Multiplex-PCR method. Qom Univ Med Sci J 2017;10(11):51-60. [Full Text in Persian]

## مقدمه

پseudomonas آئروژینوزا، باسیلی گرم منفی، اکسیداز مثبت، فاقد اسپور، دارای تازک و هوازی اجباری است (۱). از میان اعضای خانواده پseudomonas، این باکتری مهم‌ترین پاتوژن فرصت‌طلب، به‌ویژه در بیماران دارای نقص در عملکرد سیستم ایمنی مانند سوختگی، استفاده‌کنندگان از کاتترهای داخل وریدی یا ادراری، بیماران نوتروپنیک، مبتلایان به ایدز، سرطان، لوسمی و افراد مبتلا به سیستمیک فیروزیس می‌باشد (۲). این پاتوژن فرصت‌طلب، طیف وسیعی از بیماری‌ها از قبیل: عفونت زخم و سوختگی، مننژیت، عفونت دستگاه ادراری (UTI)، عفونت گوش داخلی و خارجی، کراتیت، عفونت تنفسی، استئومیلیت، گاستروانتریت، سپسیس، تب، اندوکاردیت و پنومونی را دربرمی‌گیرد (۳). مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در پseudomonas آئروژینوزا سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های آن می‌شود. اغلب سویه‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک (MDR)، توانایی تولید طیف وسیعی از آنزیم‌های بتالاکتامازی را دارند که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام، عامل مقاومت در برابر لاکتام‌ها می‌باشد (۴). Ambler براساس همولوژی پروتئین یا تشابه آمینواسیدی این پروتئین‌ها، بتالاکتامازها را به چهار گروه مختلف (A/B/C/D) تقسیم‌بندی کرد (۵). آنزیم‌های نوع A، C و D؛ سرین بتالاکتاماز هستند، اما نوع B یک متالوبتالاکتاماز (MBLs) با کوفاکتور روی است. بتالاکتامازهای نوع A و C، شایع‌ترین بوده که C همان سفالوسپوریناز می‌باشد (۶). ESBLs از بتالاکتامازهای نوع A و گروه 2be بوده و توسط پلاسמיד کد می‌شود که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل دوم، سوم و آزترونام مقاوم است (۷). این آنزیم‌ها به‌وسیله مهارکننده‌های بتالاکتاماز شامل: کلولانیک‌اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند. تاکنون بیش از ۱۵۰ نوع ESBLs شناسایی شده که ۵ نوع از آنها شامل: *SHV*، *TEM*، *VEB*، *PER*، *GES/IBC* و *OXA type* (کلاس D) در پseudomonas آئروژینوزا شناسایی شده است. *TEM* و *SHV*، سرده‌های آنزیم‌های فوق هستند و دیگر آنزیم‌ها با تغییر در توالی یک یا چند اسید آمینه در دو آنزیم مذکور حاصل می‌شوند (۸). در نمونه‌های بالینی تایپ *SHV* که فراوان‌ترین نوع، ESBLs

می‌باشد. بتالاکتامازهای *SHV* اولین بار در جنس کلبسیلا شرح داده شد و به‌عنوان بتالاکتامازهای مقاوم به پنی‌سیلین با طیف اثر کم (Narrow-spectrum) معرفی گردید. ژن کدکننده *SHV* پلاسמידی بوده و بنابراین، به‌راحتی در میان سویه‌های باکتریایی منتشر می‌شود (۹). بتالاکتامازهای *SHV* متعلق به کلاس A، طبقه‌بندی Ambler و کلاس 2be و 2b، طبقه‌بندی Bocsh بوده که به‌وسیله کلولانیک اسید؛ مهار، اما با EDTA مهار نمی‌شود. *TEM*، اولین ESBL شناسایی شده است که به‌طور وسیع در خانواده انتروباکتریاسه گسترش یافته و به‌عنوان رایج‌ترین بتالاکتاماز شناخته می‌شود و حتی به هموفیلوس آنفولانزا و نیسریا گنوره نیز انتقال یافته است (۱۰). انواع مختلفی از بتالاکتاماز نوع *TEM* با جابه‌جایی در توالی اسیدهای آمینه از *TEM-1* به‌وجود آمده‌اند. *TEM-1*، اولین بتالاکتامازی است که به‌وسیله پلاسמיד در انتروباکتریاسه‌ها کد شده و سایر باکتری‌ها از قبیل پseudomonas آئروژینوزا نیز قادر به تولید آن هستند (۱۱). گروهی از آنزیم‌های ESBLs وجود دارند که به خانواده *TEM* و یا *SHV* متعلق نبوده و بر روی سفوتاکسیم مؤثرند و تحت عنوان CTX--1 M شناسایی می‌شوند. *CTX-M*، معمولاً به‌وسیله پلاسמיד کد می‌شود. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌های طیف گسترده را داشته و توسط کلولانیک اسید و تازوباکتام مهار می‌شوند. تاکنون بیش از ۵۰ نوع *CTX-M* شناسایی شده که همگی متعلق به ۵ گروه اصلی (*CTX-M*<sub>1/2/8/9/25</sub>) هستند (۱۲). این ارگانسیم به‌علت افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌ویژه ظهور سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR)، مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از آن، هم در عرصه پزشکی و هم دامپزشکی ایجاد کرده است. همچنین گسترش ژن‌های مقاوم به دیگر سویه‌ها؛ حتی باکتری‌ها و ایجاد سویه‌های مقاوم نیز از دیگر معضلات موجود در درمان است. مطالعه حاضر با هدف شناسایی همزمان ژن‌های *CTX-M*، *bla<sub>SHV</sub>* و *TEM* در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های انسانی و دامی، به روش M-PCR و تعیین الگوی حساسیتی این سویه‌ها انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی که در طی یک بازه زمانی

۶ ماهه از ابتدای اسفند سال ۱۳۹۳ تا پایان مرداد سال ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۱۲۰ نمونه غیر تکراری، به صورت کاملاً تصادفی شامل: ۶۰ نمونه از ترشحات تنفسی بیماران بستری با علائم بالینی (پنومونی) به دلیل استفاده از دستگاه‌های تنفس مصنوعی (۹،۷) در بیمارستان‌های مختلف شهر تهران، همچنین تعداد ۶۰ نمونه از شیرخام گاوهای مبتلا به ورم پستان با علائم کاهش شیر و مقاومت به درمان، از دام‌ها (۱۳) جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه نمونه‌های به دست آمده بر روی محیط بلاد آگار، مک کانکی و ستریمید آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت از نظر تشکیل کلنی و رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تأیید کلنی‌های رشد یافته مشکوک به *Pseudomonas aeruginosa*، از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، سترات، TSI، اندول، متیل رد و وگس پروسکوئر (MR-VP)، اوره آز، تست OF (اکسیداسیون-تخمیر)، رشد در ۴۲ درجه سانتیگراد و تولید پیگمان در محیط ستریمید آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. سویه‌های تعیین هویت شده تا زمان انجام آزمایشها در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) (مرک، آلمان)، حاوی ۲۰٪ گلیسرول و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در تمامی مراحل این مطالعه، از سویه رفرانس *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 به عنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد. در ادامه، جدایه‌های تعیین هویت شده در محیط عصاره قلب - مغز آگار (BHI، مرک، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول، کشت داده شده و در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، و جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (۱۴) انجام شد. سپس ایزوله‌های که در روش کربی بائر به چندین سفالوسپورین مقاوم بودند از نظر وجود آنزیم‌های ESBLs مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور از روش دیسک ترکیبی (Combined Disk Test-CDT)، بر اساس معیارهای استاندارد آزمایشگاه و بالینی (CLSI, 2013) استفاده گردید. پس از تهیه کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند، سوسپانسیون میکروبی به صورت چمنی بر روی محیط مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس دیسک‌های سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم-کلولانیک اسید (۱۰/۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم-کلولانیک اسید (۱۰/۳۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت Mast انگلستان، به فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متر از هم بر روی محیط قرار گرفتند و یک‌شبهانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند.

(با توجه به ضوابط CLSI، اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک سفنازیدیم-کلولانیک اسید، بزرگتر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به دیسک سفنازیدیم به تنهایی بوده و یا اینکه هاله عدم رشد اطراف دیسک سفوتاکسیم-کلولانیک اسید، بزرگتر یا مساوی ۳ میلی‌متر نسبت به سفوتاکسیم به تنهایی باشد، آن سویه به عنوان مولد ESBLs در نظر گرفته می‌شود.) به منظور تکثیر ژن‌های کدکننده ESBLs، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از کیت CinnPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria, and CSF) (سیناکلون، ایران) استخراج گردید. برای تکثیر ژن‌های *bla<sub>SHV</sub>*، *CTX-M* و *TEM* از توالی‌های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ استفاده شد (جدول شماره ۱) (۱۵).

جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده نیز از دستگاه فتوبیومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. در نهایت، واکنش M-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05U/μl)، MgCl<sub>2</sub> (3mM) و dNTPs (0.4mM)، ۰/۸ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۷ میکرومولار، ۰/۷ میکرولیتر از الگو (۱۰ نانوگرم) و

۴۵ ثانیه و مرحله طول‌سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۵ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با سویه استاندارد پseudomonas آئروژینوزا، COL-1 الکتروفورز گردید.

۱۴ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گراداینت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۵ سیکل به صورت زیر انجام گرفت: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت

جدول شماره ۱: جدول توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده

نام قطعه هدف	توالی پرایمر (3'-5')	طول قطعه هدف (bp)
<b>bla<sub>TEM</sub></b>	F-TGCCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	۴۴۵
<b>bla<sub>CTX-M</sub></b>	F-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAACAGCGG	۵۹۳
<b>bla<sub>SHV</sub></b>	F- ATGCGTTATATTCGCCTGTG R- TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	۷۴۷

## یافته‌ها

۷۳ ایزوله (۶۰/۸٪) از نمونه‌های انسانی و دامی، تولیدکننده ESBLs بوده‌اند. همچنین براساس نتایج تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه مولد ESBLs، بالاترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به آموکسی‌سیلین و آمیکاسین (۱۰۰٪) در بین تمامی نمونه‌های انسانی و دامی و پایین‌ترین میزان مقاومت مربوط به سیپروفلوکساسین با فراوانی (۹۰٪) در بین نمونه‌های انسانی و (۹۳/۴٪) در بین سویه‌های دامی بود (جدول شماره ۲ و ۳). نتایج حاصل از آزمون M-PCR، به منظور تکثیر ژن‌های کدکننده ژن‌های *bla<sub>SHV</sub>*، *CTX-M* و *TEM* بر روی تمامی ۱۲۰ ایزوله‌های پseudomonas آئروژینوزا شناسایی شده با استفاده از آزمون‌های تست‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نشان داد فراوانی ژن‌های *TEM* و *bla<sub>CTX-M</sub>* به ترتیب برابر ۲۱/۶٪ (۲۶ سویه) و ۳۴/۲٪ (۴۱ سویه) می‌باشد. ژن بتالاکتاماز *SHV* در هیچ نمونه‌ای شناسایی نشد. همچنین هیچ‌یک از ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های دامی ردیابی نگردید. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول M-PCR در شکل ارائه شده است.

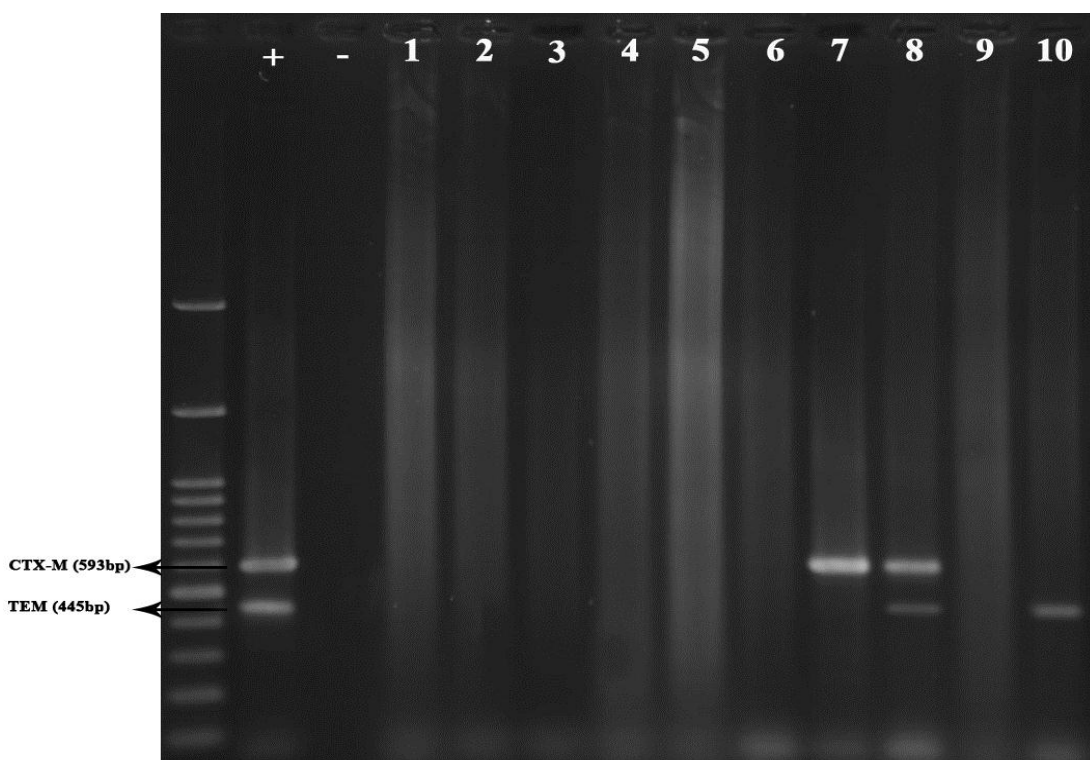
براساس مطالعات استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی، از ۱۲۰ نمونه به دست آمده انسان و دام، تعداد ۶۰ سویه از نمونه‌های انسانی و ۶۰ سویه از شیرخام تهیه شده از دام، به عنوان حجم نمونه در نظر گرفته شد. طبق نتایج، تمامی جمعیت تحت مطالعه (۱۰۰٪) مشکوک به عفونت با پseudomonas آئروژینوزا، از نظر وجود این ارگانیزم، مثبت بودند. نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مختلف نشان داد بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آموکسی‌سیلین در تمامی نمونه‌های انسانی و دامی، ۱۰۰٪ و میزان مقاومت به سفوتاکسیم در نمونه‌های انسانی، ۹۱/۶٪ و در نمونه‌های دامی، ۹۰٪ بوده است. همچنین ۹۰٪ نمونه‌های انسانی و ۹۳/۴٪ نمونه‌های دامی به سیپروفلوکساسین و ۷۳/۳٪ سویه‌های انسانی و ۸۳/۳٪ سویه‌های دامی به سفنازیدیم حساسیت داشتند. از لحاظ آماری (۰/۰۵ < p)، تفاوتی بین نتیجه آنتی‌بیوگرام در نمونه‌های انسانی و دامی مشاهده نشد. در شناسایی سویه‌های تولیدکننده ESBLs با استفاده از روش CDT مشخص گردید در مجموع،

جدول شماره ۲: میزان حساسیت سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا نمونه‌های انسانی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، بر حسب تعداد و درصد

نوع آنتی‌بیوتیک	گروه‌ها	سویه‌های مقاوم (R)	سویه‌های نیمه‌حساس (I)	سویه‌های حساس (S)
سفتناکسیم		۵۵ (٪۹۱/۶)	۴ (٪۶/۷)	۱ (٪۱/۷)
سفتازیدیم		۱۰ (٪۱۶/۷)	۶ (۱۰)	۴۴ (٪۷۳/۳)
آموکسی‌سیلین		۶۰ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
سیپروفلوکساسین		۲ (٪۳/۳)	۴ (٪۶/۷)	۵۴ (٪۹۰)
آمیکاسین		۶۰ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
جتنامایسین		۴۹ (٪۸۱/۷)	۴ (٪۶/۷)	۷ (٪۱۱/۶)
تری متوپریم - سولفامتوکسازول		۱۰ (٪۱۶/۷)	۲۶ (٪۴۳/۳)	۲۴ (٪۴۰)
توبرامایسین		۳۱ (٪۵۱/۷)	۱۷ (٪۲۸/۳)	۱۲ (٪۲۰)
سفتکسیم		۴۰ (٪۶۶/۷)	۴ (٪۶/۷)	۱۶ (٪۲۶/۶)
سپودوکسیم		۳۰ (٪۵۰)	۱۰ (٪۱۶/۷)	۲۰ (٪۳۳/۳)
تازوباکتام - پیراسیلین		۲۷ (٪۴۵)	۱۳ (٪۲۱/۷)	۲۰ (٪۳۳/۳)
سفازولین		۵۰ (٪۶۰)	۱۴ (٪۲۳/۳)	۱۰ (٪۱۶/۷)
سفتریاکسون		۲۱ (٪۳۵)	۸ (٪۱۳/۳)	۳۱ (٪۵۱/۷)
ایمی‌پنم		۴۲ (٪۷۰)	۲ (٪۳/۳)	۱۶ (٪۲۶/۷)

جدول شماره ۳: میزان حساسیت سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا نمونه‌های دامی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، بر حسب تعداد و درصد

نوع آنتی‌بیوتیک	گروه‌ها	سویه‌های مقاوم (R)	سویه‌های نیمه‌حساس (I)	سویه‌های حساس (S)
سفتناکسیم		۵۴ (٪۹۰)	۲ (٪۳/۳)	۴ (٪۶/۷)
سفتازیدیم		۷ (٪۱۱/۷)	۳ (٪۵)	۵۰ (٪۸۳/۳)
آموکسی‌سیلین		۶۰ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
سیپروفلوکساسین		۴ (٪۶/۶)	-	۵۶ (٪۹۳/۴)
آمیکاسین		۶۰ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
جتنامایسین		۷ (٪۱۱/۷)	-	۵۳ (٪۸۸/۳)
تری متوپریم - سولفامتوکسازول		۳ (٪۵)	۱۵ (٪۲۵)	۴۲ (٪۷۰)
توبرامایسین		۴۷ (٪۷۸/۴)	۳ (٪۵)	۱۰ (٪۱۶/۶)
سفتکسیم		۵۴ (٪۹۰)	۱ (٪۱/۷)	۵ (٪۸/۳)
سپودوکسیم		۴۵ (٪۷۵)	۲ (٪۳/۳)	۱۳ (٪۲۱/۶)
تازوباکتام - پیراسیلین		۴۲ (٪۷۰)	۴ (٪۶/۶)	۱۴ (٪۲۳/۳)
سفازولین		۴۸ (٪۸۰)	-	۱۲ (٪۲۰)
سفتریاکسون		۳۴ (٪۵۶/۷)	۸ (٪۱۳/۳)	۱۸ (٪۳۰)
ایمی‌پنم		-	۳ (٪۵)	۵۷ (٪۹۵)



شکل: نتایج واکنش MPCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی،  $C^+$  کنترل مثبت،  $C^-$  کنترل منفی. چاهک‌های ۱-۵ نمونه‌های پseudomonas آئروژینوزای به دست آمده از نمونه‌های دامی؛ چاهک‌های ۶-۱۰ نمونه‌های پseudomonas آئروژینوزای به دست آمده از نمونه‌های انسانی، DNA مارکر 100bp (سینازن، ایران).

## بحث

سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای مقاوم، یک تهدید جدی برای سلامت عمومی محسوب می‌شود که نگرانی‌های فراوانی را در جامعه پزشکی، به‌ویژه در بخش درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR)، در افراد با نقص سیستم ایمنی ایجاد کرده است (۱۶). نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام برای ۱۴ آنتی‌بیوتیک مختلف نشان داد ایمی‌پنم و سیپروفلوکساسین به ترتیب با حساسیتی برابر ۹۵٪ و ۹۳/۴٪ در میان نمونه‌های دامی و سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون به ترتیب با فراوانی ۹۰٪ و ۵۱/۷٪، مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها در بین نمونه‌های انسانی هستند. همچنین نتایج تست مقاومتی نشان داد تمامی ۱۲۰ نمونه جدا شده از دام و بالینی انسان (۱۰٪) دارای مقاومت به آموکسی‌سیلین و آمیکاسین بوده و در نتیجه این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان سویه‌های مقاوم به پseudomonas آئروژینوزا، ناکارآمد می‌باشند. سلیمی و همکاران (۱۷) (سال ۲۰۰۸)، میزان مقاومت به سفنازیدیم را برابر ۷۵/۲٪ اعلام کرد که با مطالعه حاضر مغایرت داشت و میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک، ۱۶/۷٪ گزارش شد.

در مطالعه ایراجیان و همکاران (۱۸) نیز میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، ۹۸/۷٪؛ به توبرامایسین، ۹۵٪ و به سفنازیدیم، ۱۰۰٪ بود. علت عدم مغایرت مطالعه این محققین با مطالعه حاضر می‌تواند در نوع نمونه، محل انجام آزمون، بازه زمانی و دیسک‌های مورد استفاده باشد. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر ایمی‌پنم (۶۳/۳٪) با مطالعه میرصالحیان (۱۹) و عزیز ژاپنی (۲۰) همخوانی داشت، ولی با دیگر مطالعات مانند خسروی و همکاران (۲۱)، صادری و همکاران (۲۲) و سلیمی و همکاران (۱۷) همخوانی نداشت. علت این عدم همخوانی می‌تواند در نتیجه تفاوت در نمونه‌ها و حجم نمونه‌گیری باشد. در مطالعه حاضر، آنالیز آماری Pearson Chi-Square نشان داد هیچ تفاوت معنی‌داری در نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام در نمونه‌های بالینی و دامی وجود ندارد. همچنین نتایج تست فنوتیپی ترکیبی، به‌منظور شناسایی سویه‌های مولد ESBLs نشان داد ۷۳ ایزوله (۶۰/۸٪)، تولیدکننده ESBLs بوده‌اند، درحالی‌که نتایج حاصل از آزمون M-PCR نشان داد فراوانی ژن‌های *CTX-M* و *TEM* به ترتیب برابر ۲۶ سویه (۲۱/۶٪)، و ۴۱ سویه (۳۴/۲٪) می‌باشد.

علت اختلافات موجود در پژوهش حاضر با سایر مطالعات می‌تواند در نتیجه اختلاف جغرافیایی، بهداشت منطقه و اقدامات کنترلی باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تشخیص آزمایشگاهی پseudomonas آئروژینوزا مولد ESBLs، حایز اهمیت است؛ زیرا توانایی انتشار به سویه‌های حساس و در نتیجه ایجاد سویه‌های مقاوم، به‌ویژه سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) وجود دارد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا، مقاومت بالایی دارند. همچنین فراوانی این ژن‌ها در بین ایزوله‌های دامی و انسانی، بالا می‌باشد. بنابراین، آزمایشگاه‌های میکروبی شناسی باید قادر باشند سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا تولیدکننده بتالاکتاماز و ژن‌های دخیل در مقاومت را تشخیص دهند، و از مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک در دامپروری جهت جلوگیری از ظهور سویه‌های مقاوم در جوامع انسانی جداً خودداری شود. همچنین پایش مداوم الگوی مقاومت به ژن‌های مختلف می‌تواند در ارائه راهکار درمانی مناسب و جلوگیری از ایجاد مقاومت به داروهای نسل جدید مؤثر باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از مدیریت و کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبی شناسی پاسارگاد تقدیر و تشکر نمایند.

ولی هیچ‌یک از نمونه‌ها واجد ژن *bla<sub>SHV</sub>* نبودند. علت اختلاف بین نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی می‌تواند در نتیجه استفاده از دیگر آنزیم‌های بتالاکتامازی مانند *NDM*، *VIM*، *GIS*، *OXA-type* و.. باشد. همچنین هیچ‌یک از ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های دامی ردیابی نشد.

در مطالعه حیدری (سال ۱۳۹۴)، فراوانی ژن *CTX-M*، برابر با ۱۳ ایزوله (۲۱/۶٪) گزارش گردید (۲۳). شکیبایی و همکاران (سال ۲۰۰۸) نیز حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف *SHV* و *TEM* را در میان سویه‌های بالینی پseudomonas آئروژینوزا مورد بررسی قرار دادند که از میان ۱۲۰ سویه پseudomonas آئروژینوزا، ۴۱ سویه (۳۴٪)، به‌عنوان تولیدکننده ESBL شناسایی شدند و بعد از انجام PCR، فراوانی ژن‌های مذکور به ترتیب برابر ۴/۱ و ۲/۵٪ بود (۲۴). شاهچراغی (سال ۲۰۰۹) در بررسی مولکولی بتالاکتامازهای *TEM* و *SHV* در ۶۰۰ سویه باکتری پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های زخم در دو بیمارستان تهران، نشان داد توزیع ژن‌های بتالاکتاماز *SHV* و *TEM* به ترتیب ۲۲ و ۹٪ می‌باشد (۲۵). Bradford و همکاران (۲۶) نیز نشان دادند بیشترین فراوانی آنزیم‌های ESBL در ایالات متحده مربوط به خانواده *TEM* بتالاکتاماز بوده است. در یک مطالعه در ترکیه (۲۷) بر روی نمونه‌های باکتری‌های روده‌ای به‌دست آمده از بیمارستان، شیوع ژن *TEM-1*، ۵۲/۷٪ برآورد گردید، درحالی‌که در ایتالیا این میزان، ۵۶/۴٪ گزارش شد (۲۸).

### References:

- Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, pel, and psl. *Front Microbiol* 2011;2:167.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006;36(2):78-91.
- Navon-Venezia S, Bem-Ami R, Carmeli Y. Update on Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumani Infections in the Healthcare Setting. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(4):306-13.
- Del MM, de AP. Mecanismo de resistencia detection das betalactamases de espectro ampliado. *Ciênc Biol Saúde Londrina* 2005;7(1):59-63.

5. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo beta lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3129-35.
6. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, et al. Multifocal outbreaks of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad spectrum beta lactams including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(2):349-53.
7. Hemalatha V, Uma S, Vijaylakshmi K. Detection of metallo betalactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients. *Indian J Med Res* 2005;122(2):148-52.
8. Bonnet R. Growing group of extended spectrum  $\beta$ -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(1):1-14.
9. Rodrigues AC, Chang MR, Nobrega GD, Rodrigues MS, Carvalho NC, Gomes BG, et al. Metallo-beta-lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011;15(3):195-9.
10. Martino DP, Gagniere H, Berry H, Bret J. Anti-biotic resistance and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* strains from mechanically ventilated patients with Pneumonia in Intensive Care Units: Comparison with imipenem resistant extra-respiratory tract isolates from uninfected patients. *Microbes Infect* 2002;4(6):613-20.
11. Chen H, Yuan M, Livermore D. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol* 1995;43(4):300-9.
12. Tzouveleki LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: An emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14(2):137-42.
13. Shem M, Malole J, Machangu R, Kurwijila L, Fujihara T. Incidence and causes of sub-clinical mastitis in dairy cows on smallholder and large scale farms in tropical areas of Tanzania. *Asian Australas J Anim Sci* 2001;14(3):372-7.
14. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement: Setting the standard for quality in clinical laboratory testing around the world. *Clin Lab Stand Inst (M100-S25)* 2015;35(3):2-16.
15. Zaranza AV, Morais FC, Carmo MS, Marques AM, Andrade-Monteiro C, Ferro TF, et al. Antimicrobial susceptibility, biofilm production and adhesion to HEp-2 cells of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples. *J Biomater Nanobiotechnol* 2013;4(3):98-106.
16. Wirth FW, Picoli SU, Cantarelli VV, Gonçalves ALS, Brust FR, Santos LMO, et al. Metallo- $\beta$ -Lactamase and *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2009;13:170-2.
17. Salami H, Owlia P, Yakhchali B, Rastegar Lari A. Drug susceptibility and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn unit. *Am J Infect Dis* 2009;5(4):308-13.
18. Fazeli H, Moslehi TZ, Irajian GR, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). *Iranian J Med Microbiol* 2009;3(4):1-8. [Full Text in Persian]
19. Mirsalehian A, Feyzabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jebel Ameli F, Goli H. Prevalence of extended spectrum beta lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J Tehran Univ Med Sci* 2008;66(5):333-7. [Full Text in Persian]
20. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad SH. Susceptibility patterns and cross resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the south of Iran. *Burns* 2006;32(3):343-7.
21. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60(1):125-8.



22. Sadari H, Karimi Z, Owlia P, Bahar MA, Akhavi Rad SMB. Phenotypic Detection of Metallo- beta- lactamase producing Pseudomonas aeruginosa strain Isolated from Burned patients. Iran J Pathol 2008;3(1):20-24. [Full Text in Persian]
23. Haidari E, Aky A. The frequency of broad-spectrum beta-lactamase CTXM genotypes in Pseudomonas aeruginosa isolated from Kermanshah hospitals (2013-14). J Kermanshah Univ Med Sci 2015;19(4):207-14. [Full Text in Persian]
24. Shacheraghi F, Shakibaie MR, Noveiri H. Molecular Identification of ESBL Genes bla GES-1, blaVEB-1, blaCTX-M blaOXA-1, blaOXA-4,blaOXA-10 and blaPER-1 in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Burn Patients by PCR, RFLP and Sequencing Techniques. Int J Biol Life Sci 2010;6(3):138-42.
25. Shacheraghi F, Nikbin V, Shorj F, Shafii M. Molecular Identification of bla IMP-1, bla VIM-1, bla SPM in Pseudomonas aeruginosa isolated from hospitalized patients in Imam Khomeini hospital. J Shahid Beheshti Medi Sci 2009;2:67-72. [Full Text in Persian]
26. Bradford PA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14(4):933-51.
27. Gur D, Gulay Z, Akan OA, Aktaş Z, Kayacan CB, Cakici O, et al. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: Results of the multicenter HITIT study. Mikrobiyol Bul 2008;42(4):537-44.
28. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. J Clin Microbiol 2004;42(6):2523-9.

## Identification of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>TEM</sub> Genes in *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Isolated from Human and Animal Samples Using Multiplex-PCR Method

Farzaneh Farzali Shirehjini<sup>1</sup>, Kioumars Amini<sup>\*</sup>, Hossein Fatahi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

**\*Corresponding Author:**  
**Kioumars Amini,**  
Department of Microbiology,  
Faculty of Basic Sciences,  
Saveh Branch, Islamic Azad  
University, Saveh, Iran.

Email:  
dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

Received: 8 Jun, 2015

Accepted: 22 Feb, 2016

### Abstract

**Background and Objectives:** *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causes of opportunistic infections. The infection caused by *P. aeruginosa* is commonly severe and life-threatening and hard to treat due to limited susceptibility to antibiotics and development of resistance during treatment. The aim of the present study was to identify *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>TEM</sub> genes in *P. aeruginosa* strains isolated from human and animal samples using Multiplex-PCR method.

**Methods:** In this descriptive cross-sectional study, a total of 120 isolates of *P. aeruginosa* were obtained from human samples and animal raw milk. Antibiotic susceptibility test was determined by gel diffusion method and according to CLSI guidelines. Cellular DNA was extracted by CinnaPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram-negative Bacteria and CSF) and Multiplex-PCR was performed for identification of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>TEM</sub> genes.

**Results:** In this study, the highest resistance in human and animal samples, was seen to amoxicillin and amikacin (100%) and the lowest resistance was to ciprofloxacin with frequency of 90% in human samples and 93.4% in animal samples. Based on the CDT results, 37(60.8%) isolates showed ESBLs phenotype, and based on the M-PCR results, 26 (21.6%) and 41 (34.2%) strains had *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes, respectively.

**Conclusion:** The results of this study indicated that *P. aeruginosa* strains have high levels of resistance. Also, the frequency of these genes is high among human and animal isolates, therefore controlling these bacteria in humans and animals is of particular importance.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; Beta-lactamase; Antibiotic susceptibility; Drug hypersensitivity.