Avicenna Journal of Clinical Medicine No 86, Volume 24, Issue 4, Winter 2018, Pages: 277-284

Original Article

DOI: 10.21859/ajcm.24.4.277

# Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Different Antibiotic Groups in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Containing *p-AmpC* and Their Relationship with Antibiotic Resistance Pattern

**Hamed Tahmasebi[1], Mohammad Yousef Alikhani[2], Sanaz Dehbashi[3], Mohammad Reza Arabestani[4,5,*]**

[1] *MSc in Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran*
[2] *Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[3] *PhD Student in Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[4] *Asociate Peofessor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[5] *Asociate Peofessor, Nutrition Health Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

**** Corresponding Author:*** *Mohammad Reza Arabestani, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: mohammad.arabestani@gmail.com*

**Received:** 05.09.2017
**Accepted:** 15.01.2018

**How to Cite this Article:**
Tahmasebi H, Alikhani MY, Dehbashi S, Arabestani MR. Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Different Antibiotic Groups in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Containing *p-AmpC* and Their Relationship with Antibiotic Resistance Pattern. *Avicenna J Clin Med*. 2018; 24(4): 277-284. DOI: 10.21859/ajcm.24.4.277.

## Abstract

**Background and Objective:** *AmpC*-type beta-lactamases have been implicated in group C of Amber, which includes *EBC*, *CIT*, *MOX*, *FOX*, *DHA*, and *ACC*. The active presence of these plasmid genes in clinical isolates of *P.aeruginosa* has resulted in resistance to a wide range of antibiotics. Therefore, we aimed to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) of different antibiotic groups in clinical isolates of *P. aeruginosa* carrying *AmpC* enzyme and study their relationship pattern.

**Materials and Methods:** In this descriptive study, the MIC of 95 *P. aeruginosa* isolates was determined using E-test for cefocytosine, cefpodoxime, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, colicitin, aztreonam, and ceftriaxone antibiotics (Liofilchem, Italy). Multiplex polymerase chain reaction was used to amplify and identify plasmid genes. The Chi-squared test was used to determine the relationship between variables.

**Results:** Of the 95 *P. aeruginosa* isolates, 95 (100%) isolates were resistant to cefoxitin, 79 (83.5%) isolates to cefpodoxime, 2 (2.1%) isolates to ceftazidime, 87 (81.57%) isolates to ceftriaxone, and 22 (23.15%) isolates were resistant to aterranum, but none of the isolates was resistant to colistin. In addition, 21 (22.1%) isolates had *FOX* gene, 13 (11.57%) isolates had *AAC* gene, 7 (36.6%) isolates had *MOX* gene, 4 (21.4%) isolates had *CIT* gene, 2 (2.1%) isolates had *DHA* gene, and 1 (1.05%) isolate had *EBC* gene. It is worth mentioning that there was a significant relationship between the presence of plasmid genes and antibiotic resistance (level of significance: $P \leq 0.05$).

**Conclusion:** The presence of the genes encoding the *AmpC* enzyme can provide the ground for resistance to a broad range of antibiotics.

**Keywords:** Beta-lactamase Enzyme, Beta-lactamase Resistance, Minimum Inhibitory Concentration, *Pseudomonas aeruginosa*

**Copyright** © 2018 Avicenna Journal of Clinical Medicine

مقاله پژوهشی

doi: 10.21859/ajcm.24.4.277

# تعیین حداقل غلظت مهاری گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* حامل *AmpC* پلاسمیدی و بررسی ارتباط آن‌ها با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

**حامد طهماسبی[۱]، محمد یوسف علیخانی[۲]، ساناز ده‌باشی[۳]، محمد رضا عربستانی[۴،۵،*]**

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

[۲] استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[۳] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[۴] دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[۵] دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* **نویسنده مسئول:** محمد رضا عربستانی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، همدان، ایران.

ایمیل: mohammad.arabestani@gmail.com

**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۳۹۶/۰۶/۱۴

**تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

**چکیده**

**سابقه و هدف:** بتالاکتاماز نوع *AmpC* در گروه Amber Class C قرار می‌گیرد و شامل: *CIT*، *EBC*، *MOX*، *FOX*، *DHA* و *ACC* می‌باشد. حضور فعال این ژن‌های پلاسمیدی در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا منجر به مقاومت به طیف بسیار وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شده است. در این راستا هدف از مطالعه حاضر، تعیین حداقل غلظت مهاری نسبت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا حامل *AmpC* و بررسی الگوی ارتباط آن‌ها می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی، حداقل غلظت مهاری ۹۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از نوارهای E-test آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفپودوکسیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، کولیسیتین، آزترئونام و سفتریاکسون (ساخت شرکت Liofilchem، ایتالیا) مشخص گردید. همچنین، به‌منظور تکثیر و شناسایی ژن‌های پلاسمیدی، روش Multiplex PCR مورد استفاده قرار گرفت و از آزمون آماری Chi-Square برای تعیین ارتباط بین متغیرها بهره گرفته شد.

**یافته‌ها:** از ۹۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای مورد بررسی، ۹۵ ایزوله (۱۰۰ درصد) به سفوکسیتین، ۷۹ ایزوله (۸۳/۵ درصد) به سفپودوکسیم، ۲ ایزوله (۲/۱ درصد) به سفتازیدیم، ۸۷ ایزوله (۸۱/۵۷ درصد) به سفتریاکسون و ۲۲ ایزوله (۲۳/۱۵ درصد) به آزترئانوم مقاومت داشتند؛ اما هیچ‌یک از ایزوله‌ها به کولیستین مقاوم نبودند. علاوه‌براین، ۲۱ ایزوله (۲۲/۱ درصد) دارای ژن *FOX*، ۱۳ ایزوله (۱۱/۵۷ درصد) دارای ژن *AAC*، ۷ ایزوله (۷/۳۶ درصد) دارای ژن *MOX*، ۴ ایزوله (۴/۲۱ درصد) دارای ژن *CIT*، ۲ ایزوله (۲/۱ درصد) دارای ژن *DHA* و ۱ ایزوله (۱/۰۵ درصد) دارای ژن *EBC* بودند. شایان ذکر است که ارتباط معناداری بین حضور ژن‌های پلاسمیدی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌دست آمد (سطوح معناداربودن $P\leq ۰/۰۵$).

**نتیجه‌گیری:** حضور ژن‌های کدکننده آنزیم *AmpC* می‌تواند زمینه مناسبی را برای بروز مقاومت به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها فراهم کند.

**واژگان کلیدی:** آنزیم بتالاکتاماز، حداقل غلظت مهاری، *سودوموناس آئروژینوزا*، مقاومت بتالاکتامی

## مقدمه

امروزه، تولید بتالاکتامازها توسط پاتوژن‌های گرم منفی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مطرح است. بتالاکتامازها، آنزیم‌های باکتریایی می‌باشند که قادر هستند آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز کنند و سبب بی‌اثرشدن این ترکیبات شوند [۱]. *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، یک باکتری گرم منفی است

که به‌عنوان عاملی مهم در ایجاد عفونت در بیماران بستری و نیز بیماران با سیستم ایمنی ضعیف‌شده (از جمله بیماران دچار سوختگی و سیستیک فیبروزیس) مطرح می‌باشد. با وجود بهبود و ارتقای روش‌های درمانی و بهداشتی، خطر بروز عفونت ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران بستری در بخش ICU زیاد است [۲]. میزان مرگ و میر در بیماران دچار باکتریمی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا*، ۳۰ تا ۵۰ درصد و در بیماران دچار پنومونی بیمارستانی، تا بیش از ۷۰ درصد گزارش شده است. *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان یک پاتوژن مهم محسوب می‌شود که نسبت به سایر باکتری‌های گرم منفی به میزان بیشتری نسبت به عوامل ضدمیکروبی مقاومت ذاتی دارد. مشکل مقاومت ذاتی این باکتری با بروز مقاومت اکتسابی رو به گسترش نسبت به عوامل ضدمیکروبی که به‌طور معمول دارای فعالیت علیه این پاتوژن هستند، همراه می‌باشد [۳]. این پاتوژن در کنار باکتری‌هایی مانند *اشریشیا کولی* (*Escherichia coli*)، *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*) و *آسینتوباکتر بومانی* (*Acinetobacter baumannii*) می‌تواند زمینه‌ساز عفونت‌های بیمارستانی در بیماران بستری در بیمارستان‌ها شود. علاوه‌براین، این باکتری به‌دلیل برخورداری از گروه‌های آنزیمی مختلف، نسبت به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی مقاومت پیدا کرده است [۴]. براساس طبقه‌بندی Amber، چهار گروه بر مبنای وجود عوامل مختلف در ساختار باکتری وجود دارد. بتالاکتامازهای نوع *AmpC* در گروه C قرار گرفته و شامل خانواده‌های ژنی *CMY*، *LAT*، *BIL*، *ACT MOX*، *FOX*، *DHA* و *ACC* می‌باشند که در این میان، *CMY-2* شایع‌ترین و رایج‌ترین نوع توزیع‌شده جغرافیایی این گروه است. بتالاکتامازهای نوع *AmpC* در اواخر دهه ۱۹۷۰ ظاهر شده و مورد بررسی قرار گرفت. این آنزیم‌ها، سفالوسپورین‌های با دامنه وسیع مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم و مونوباکتام‌هایی مانند آزترونام و سفامایسین‌ها را هیدرولیز می‌نمایند و توسط مهارکننده‌های معمولی مانند کلاوولانات مهار نمی‌شوند [۵].

در اواخر دهه ۱۹۸۰ این ژن‌های کروموزومی قابل القا روی پلاسمیدهای ارگانیسم‌هایی که به‌طور ذاتی این نوع بتالاکتاماز را بیان نمی‌کردند، ظاهر شدند. مطالعه در ارتباط با بتالاکتامازهای نوع *AmpC* از اواخر دهه ۱۹۷۰ آغاز گردید [۶]. آنزیم‌های *AmpC* که اغلب قابل القا توسط بتالاکتام‌ها هستند، به‌وسیله ژن‌های کروموزومی کد می‌شوند و در بسیاری از باسیل‌های گرم منفی وجود دارند. تاکنون بیش از ۲۰ بتالاکتاماز مختلف نوع *AmpC* با واسطه پلاسمید شناسایی شده‌اند. این آنزیم از طریق پلاسمید می‌تواند به *سودوموناس آئروژینوزا* منتقل شده و مقاومتی گسترده را سبب شود [۷]. افزون‌براین، آنزیم *AmpC* نسبت به مهار با اسید کلاولانیک مقاوم بوده و از نظر بیولوژیک، مقاومت به سفامایسین‌ها را به‌خوبی ایجاد می‌کند. لازم به ذکر است که بیشتر آنزیم‌های *AmpC*، سفالوسپورینز هستند؛ اما تاحدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها نظیر پنی‌سیلین‌ها را نیز دارا می‌باشند. باید عنوان نمود که با گذشت مدت‌زمان کمی، مقاومت‌های گسترده به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی گسترش یافت و به سایر باکتری‌های فاقد مقاومت نظیر *کلبسیلا*، *اشریشیا کلی* و گونه‌های مختلفی از *سودوموناس* و *آسینتوباکتر* منتقل گردید [۵].

شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در کنار شناسایی سویه‌های حامل خانواده‌های ژنی مختلف *AmpC* می‌تواند علاوه‌بر تعیین میزان شیوع و ظهور سویه‌های جدید، ارتباط بین حضور برخی از این ژن‌ها و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دارای دامنه گسترده را مشخص سازد؛ ازاین‌رو هدف از مطالعه حاضر، تعیین حداقل غلظت مهاری گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* حامل *AmpC* پلاسمیدی و بررسی ارتباط آن‌ها با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بود تا بدین‌طریق، این ارتباط آماری ارزیابی شود.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، در بازه زمانی دی ماه ۱۳۹۵ تا تیر ماه ۱۳۹۶طی یک دوره ۷ ماهه، ۳۳۹ نمونه بالینی مختلف شامل: کاتاتر، خون، ادرار، مایع مغزی- نخاعی، زخم، ترشحات، تراشه، زخم سوختگی، بزاق و غیره از بیماران جداسازی گردید. نمونه‌گیری در بیمارستان‌های آموزشی (بعثت و سینا) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهر همدان صورت گرفت و بیمارانی برای نمونه‌گیری انتخاب شدند که بیشتر از دو هفته در بیمارستان بستری شده و مشکوک به عفونت باکتریایی بودند. ذکر این نکته ضرورت دارد که روش نمونه‌گیری براساس نمونه‌گیری آسان و در دسترس طراحی شد و جنس و گونه *سودوموناس* توسط آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف تعیین گردید [۸،۹].

برای تعیین سویه‌های تولیدکننده ESBL از روش انتشار از دیسک استفاده شد. بر این اساس، دیسک ترکیبی سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)/ کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) در فاصله ۳۰ میلی‌متری از دیسک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) و دیسک سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم) به فاصله ۳۰ میلی‌متر از دیسک سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم)/ کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) روی محیط کنار یکدیگر قرار داده شدند [۱۰]. همچنین، به‌منظور بررسی وجود *AmpC* از دیسک‌های سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و سفپودوکسیم (۱۰ میکروگرم) به همراه ترکیبات مهارکننده آنزیم *AmpC* استفاده شد. شایان ذکر است که تمام آنتی‌بیوتیک‌ها ساخت شرکت MAST، کشور انگلستان بود. در این روش براساس مطالعه تام و همکاران، غربالگری اولیه برای حضور *AmpC* مورد بررسی قرار گرفت؛ به‌طوری که درصورت وجود اختلاف قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی با اسید کلاولانیک با قطر هاله عدم رشد دیسک فاقد اسید کلاولانیک به

میزان بیش‌تر یا مساوی ۵ میلی‌متر، آن نمونه از نظر حضور ESBL مثبت لحاظ گردید. شایان توجه است که اگر قطر هاله عدم رشد سفوکسیتین کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر بود، تولیدکننده *AmpC* درنظر گرفته می‌شد [۱۱].

از سوی دیگر، حداقل غلظت مهاری برای آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفپودوکسیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سیپرو-فلوکساسین، کولیسیتین، آزترئونام و سفترياکسون با استفاده از نوارهای E-test (ساخت شرکت Liofilchem، ایتالیا) مشخص گردید. همچنین، به‌منظور تعیین حداقل غلظت مهاری از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 700603) به‌عنوان نمونه کنترل مثبت و از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) به‌عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد [۱۱،۱۲].

علاوه‌براین به‌منظور استخراج پلاسمید، از کیت استخراج (ساخت شرکت سینا کلون، کشور ایران) استفاده شد. بدین‌ترتیب که ابتدا یک کلنی از هر ایزوله کشت داده شده روی محیط مولر هینتون آگار (MHA: Mueller Hinton Agar) (ساخت شرکت Merck، کشور آلمان) با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریابرتانی براث (LB: Luria-Bertani Broth) (ساخت شرکت Sigma-Aldrich، کشور آمریکا) تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، مراحل استخراج پلاسمید با استفاده از پروتکل کیت پی انجام شد. ذکر این نکته ضرورت دارد که پلاسمیدهای حاصل تا زمان انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰- درجه ذخیره‌سازی گردید [۱۰].

از سوی دیگر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای موجود در جدول ۱ و همچنین تکنیک Multiplex با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۲ میکرولیتر از پلاسمید، ۱میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۱/۵ میکرولیتر از مستر میکس (ساخت شرکت Ampliqon، کشور دانمارک) بود. شایان توجه است که حجم باقی‌مانده با استفاده از آب مقطر دیونیزه جبران شد و از مخلوط PCR فاقد پلاسمید به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

سپس، آزمون PCR برای ژن‌های *AmpC* با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت BioRad، کشور آمریکا) شامل: دناتوراسیون اولیه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۶ درجه به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت. طویل‌سازی نهایی نیز به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. درادامه، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز رنگ‌آمیزی‌شده با Gel Red (ساخت شرکت Biotium، کشور آمریکا) ۲/۵ درصد الکتروفورز گردید. درنهایت، نتیجه نهایی توسط دستگاه ژل داکت بررسی و از آن عکس تهیه شد. از مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز (ساخت شرکت Thermofisher، کشور آمریکا) نیز برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد [۱۳].

افزون‌براین، داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 16 و با استفاده از آزمون Chi-Square و ضریب کاپا (Kappa Coefficient) تجزیه و تحلیل شدند و مقادیر (P≤۰/۰۵) به‌عنوان شاخص معناداربودن درنظر گرفته شد.

**جدول ۱:** مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های *AmpC* در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

| ژن | نام پرایمر | توالی نوکلئوتیدها | طول آمپلیکون (جفت باز) | شماره دسترسی در GenBank | منبع |
|---|---|---|---|---|---|
| *MOX* | MOXMF<br>MOXMR | GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT<br>CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C | ۵۲۰ | D13304 | [۱۳] |
| *CIT* | CITMF<br>CITMR | TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA<br>TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC | ۴۶۲ | X78117 | [۱۳] |
| *DHA* | DHAMF<br>DHAMR | AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T<br>CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC | ۴۰۵ | Y16410 | [۱۳] |
| *EBC* | EBCMF<br>EBCMR | TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG<br>CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT | ۳۰۲ | M37839 | [۱۳] |
| *FOX* | FOXMF<br>FOXMR | AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G<br>CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG | ۱۹۰ | X77455 | [۱۳] |
| *ACC* | ACCMF<br>ACCMR | AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA<br>TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC | ۳۴۶ | AJ133121 | [۱۳] |

## یافته‌ها

از ۹۵ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، ۲۶ ایزوله (۲۷/۳۶ درصد) از خون، ۱۲ ایزوله (۱۲/۶۳ درصد) از ادرار، ۱۴ ایزوله (۱۴/۷۳ درصد) از زخم، ۲۰ ایزوله (۲۱/۰۵ درصد) از زخم سوختگی، ۱۵ ایزوله (۱۵/۷۸ درصد) از کاتاتر، ۱۰ ایزوله (۹/۵ درصد) از ترشحات و ۶ ایزوله (۶/۳ درصد) از سایر نمونه‌ها جداسازی شد. همچنین ۷۹ ایزوله از نظر فنوتیپی، تولیدکننده *AmpC* و ۹۱ ایزوله از نوع ESBL بودند (جدول ۲). به لحاظ حداقل غلظت مهاری نیز ۶۶ ایزوله دارای

**جدول ۲:** فراوانی ایزوله‌های *سودوموناس آئروزینوزا* مولد آنزیم *ESBL* و *AmpC* براساس آزمون‌های فنوتیپی در بیماران زن و مرد

| جنسیت | *سودوموناس آئروژینوزا* (n=۹۵) | |
|---|---|---|
| | (n=۹۱) ESBL | (n=۴۹) *AmpC* |
| | تعداد (درصد) | |
| زن | ۷۰ (۷۶/۹۲) | ۴۰ (۸۱/۲۳) |
| مرد | ۲۱ (۲۳/۰۷) | ۹ (۱۸/۳۶) |

حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به سفوتاکسیم، ۲۲ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به آزترئانوم، ۸۷ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به سفتریاکسون، ۲ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به سفتازیدیم و ۹۵ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به سفوکسیتین بودند. شایان ذکر است که هیچ‌یک از ایزوله‌های مورد بررسی، مقاوم به کولیسیتین نبودند و تنها ۳ ایزوله دارای غلظت مهاری ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند که به‌عنوان نیمه‌حساس درنظر گرفته شدند (شکل ۱) (جدول ۳).

با بررسی‌های انجام‌شده در ارتباط با تمامی ایزوله‌های مورد مطالعه مشاهده شد که از مجموع ۹۵ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*، ۲۱ ایزوله (۲۲/۱ درصد) دارای ژن پلاسمیدی *Fox*، ۱ ایزوله (۱/۰۵ درصد) دارای ژن پلاسمیدی *EBC*، ۱۳ ایزوله (۱۱/۵۷ درصد) دارای ژن پلاسمیدی *ACC*، ۲ ایزوله (۲/۱ درصد) دارای ژن پلاسمیدی *DHA*، ۴ ایزوله (۴/۲۱ درصد) دارای ژن پلاسمیدی *CIT* و ۷ ایزوله (۷/۳۶ درصد) دارای ژن پلاسمیدی *Mox* بودند (شکل‌های ۲ و ۳).

علاوه‌براین، با توجه به بررسی آماری صورت‌گرفته مشخص گردید که در تمامی ۹۵ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* مورد مطالعه، ارتباط معناداری بین حضور خانوده‌های ژنی *AmpC* پلاسمیدی و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی با سطح اطمینان (P≤۰/۰۵) به‌دست آمد که نشانگر آن بود که سویه‌های دارای بیشترین مقادیر MIC به لحاظ پراکنش ژن‌های *AmpC*، فراوانی بیشتری را به خود اختصاص داده‌اند. افزون‌براین، تنها سویه PA43 در کنار مقاومت کامل به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های بررسی‌شده به لحاظ حضور تمامی خانواده‌های ژنی *AmpC* پلاسمیدی مثبت بود؛ این درحالی بود که مقادیر قطر هاله مقاومت به‌دست آمده برای هر آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه برای سفوتاکسیم معادل (P≤۰/۰۱۹)، آزترئانوم (P≤۰/۰۱۲)، سفتریاکسون (P≤۰/۰۱۴)، سفتازیدیم (P≤۰/۰۱۸)، سفپودوکسیم (P≤۰/۰۱)، کولیسیتین (P≤۰/۰۱) و برای سفوکسیتین برابر با (P≤۰/۰۱۱) به‌دست آمد.

**شکل ۱:** حداقل غلظت مهاری ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*

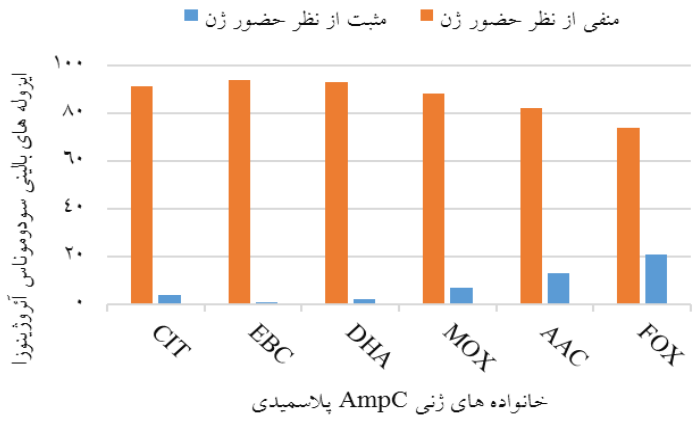
## بحث

مقاومت به بتالاکتام‌ها به‌واسطه حضور آنزیم *AmpC* بتالاکتامازی، یکی از مهم‌ترین چالش‌های بخش بالینی به‌شمار می‌رود. این آنزیم که به‌طور طبیعی توسط تعدادی از باکتری‌ها گرم منفی تولید می‌شود، سبب ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها (به‌جز سفپیروم و سفپیم) می‌گردد. *AmpC* به‌واسطه پلاسمید در میان بسیاری از جدایه‌های بالینی (به‌ویژه خانواده انتروباکتریاسه) منتشر شده و معضلات فراوانی را در جهت ظهور سویه‌های دارای مقاومت‌های گسترده و چندگانه به

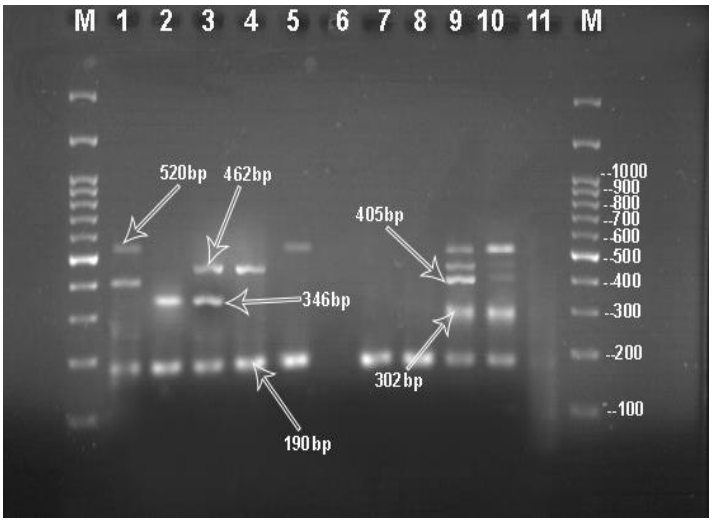
**جدول ۳:** فراوانی ژن‌های عامل آنزیم *AmpC* براساس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*

| ژن‌های مورد مطالعه | فراوانی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* دارای مقاومت | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | تعداد کل ژن‌ها |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | سفوتاکسیم | | | آزترئانوم | | | سفتریاکسون | | | سفتازیدیم | | | سفپودوکسیم | | | کولیستین | | | سفوکسیتین | | |
| | R* | I* | S* | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S | |
| *FOX* | ۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۴ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۹ | ۰ | ۰ | ۲۱ |
| *AAC* | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۴ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۶ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۰ | ۱۳ |
| *MOX* | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۳ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۷ |
| *DHA* | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۰ | ۲ |
| *EBC* | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۱ |
| *CIT* | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۴ |

R: Resistant
I: Intermediate
S: Sensitive




**شکل ۲:** فراوانی خانوده‌های ژنی *AmpC* پلاسمیدی




**شکل ۳:** نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های خانواده *AmpC* بر ژل آگارز ۲/۵ درصد

چاهک ۱ تا ۹: ایزوله دارای ژن *MOX* (۵۲۰ bp)، *ACC* (۳۴۶ bp)، *CIT* (۴۶۲ bp)، *FOX* (۱۹۰ bp)، *DHA* (۴۰۵ bp)، *EBC* (۳۰۲ bp)؛ چاهک ۱۰: کنترل مثبت سویه استاندارد، سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603؛ چاهک ۱۱: کنترل منفی؛ چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی

آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ایجاد می‌کند.

فعالیت گروه‌های ژنی پلاسمیدی سبب ظهور سویه‌هایی می‌شود که به‌طور فنوتیپی نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و سفالوپورینی مقاومت پیدا کرده‌اند.

*سودوموناس آئروژینوزا* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد که به‌واسطه این فعالیت ژنی، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی فراوانی مقاومت پیدا کرده است. حضور و فعالیت این سویه‌های مقاوم در بیماران بستری در

بیمارستان می‌تواند مسیر درمان را با مشکل مواجه سازد. نتایج به‌دست آمده از تعیین حداقل غلظت مهاری آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفپودوکسیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سیپرو-فلوکساسین، کولیسیتین و آزترئونام در مطالعه حاضر با یافته‌های مطالعه‌ای که یایان و همکاران در سال ۲۰۱۵ در آلمان انجام دادند، مطابقت داشت؛ به‌طوری که در این مطالعه میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی، بیش از ۴۰ درصد گزارش شده بود [۱۴]. همچنین، در مطالعه‌ای که برازگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ در فرانسه انجام دادند، مشخص شد که آنتی‌بیوتیک‌های آزترئانوم و سفتازیدیم به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان مقاومت در بین سویه‌های مورد بررسی بودند. علاوه‌براین، در مطالعه فوق حضور آنتی‌بیوتیک با نوع جهش‌های ژنی *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفته بود که در این راستا مشاهده شد که حضور برخی از جهش‌های ژنی می‌تواند ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه‌ای را رقم بزند [۱۵]. از سوی دیگر، در مطالعاتی که توسط بوچند و همکاران (۲۰۱۲) در هند صورت گرفت، مشخص شد که سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به سفتازیدیم و آزترئانوم داشتند. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی ندارد. از مهم‌ترین دلایل عدم همخوانی مطالعات مختلف می‌توان به وجود جهش‌های متفاوت در ایزوله‌های جداشده از هر منطقه، میزان مصرف آنتی‌بیوتیک توسط افراد و جداسازی نمونه در فصول مختلف سال اشاره کرد. اختلافات جغرافیایی نیز می‌تواند زمینه‌ساز تفاوت در نوع و ماهیت ژنتیکی برخی از ایزوله‌های بالینی باشد [۱۶].

علاوه‌براین، مطالعات ژنتیکی خانواده‌های ژنی *AmpC* پلاسمیدی نشان داد که بیشترین شیوع ژنی مربوط به ژن‌های *FOX* و *AAC* می‌باشد؛ این درحالی است که ژن *EBC* دارای کمترین فراوانی در این خانواده ژنی بود. در مطالعاتی که ژو و همکاران (۲۰۱۳) در ارتباط با ژن‌های پلاسمیدی *AmpC* انجام دادند، گزارش شد که درمجموع، ۲۸ ایزوله (۲۵/۱۴ درصد) *سودوموناس آئروژینوزا* دارای ژن‌های *AmpC* بودند. در این راستا، در مطالعه حاضر فراوانی سویه‌های تولیدکننده آنزیم *AmpC* از مجموع ۹۵ ایزوله معادل ۲۲/۱ درصد به‌دست آمد که با نتایج مطالعه ذکرشده همخوانی دارد [۱۷]. در بسیاری از مطالعات صورت‌گرفته در مورد حضور و مکانیسم فعالیت ژن‌های *AmpC* و خانواده‌های مختلف Amp، گزارش شده است که حضور آنتی‌بیوتیک‌های مختلف که اثر عملکردی متفاوتی دارند، می‌تواند ژن‌های تنظیمی خانواده *AmpC* را به نوعی تغییر دهد که تظاهرات مقاومتی جدیدی را در پی داشته باشد. حضور ژن‌های تنظیمی مانند *AmpR* در سویه‌های مختلف، تأییدکننده این مطلب است که بالابودن مقادیر حداقل غلظت مهاری سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* طی سال‌های اخیر، به‌دلیل فعالیت‌های این گروه‌های تنظیمی به‌شدت افزایش یافته است [۱۸]. البته، در مطالعاتی که رولاند و همکاران (۲۰۱۴) در ارتباط با انتروباکتریاسه‌های بیمارستانی انجام دادند، عنوان نمودند که در بین باکتری‌های بیمارستانی، مقادیر حداقل غلظت مهاری در سویه‌های دارای ژن‌های پلاسمیدی *AmpC* تفاوت چشمگیری با سویه‌های فاقد این ژن‌ها ندارد [۱۹]؛ این درحالی بود که در این مطالعه ارتباط معناداری بین الگوی حداقل غلظت مهاری و ژن‌های عامل تولید آنزیم *AmpC* مشاهده گردید؛ به‌طوری که ایزوله‌های دارای ژن‌های عامل *AmpC* از بیشترین مقادیر MIC برخوردار بودند. علاوه‌براین، ایزوله‌های فاقد گروه‌های ژنی *AmpC* در تمامی موارد به‌لحاظ مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، فاقد مقامت بودند؛ به‌طوری که در مطالعه حاضر در هیچ‌یک از سویه‌های حساس و نیمه‌حساس گروه‌های ژنی مورد بررسی مشاهده نشد. از سوی دیگر، در مطالعه همتی و همکاران مشاهده شد که الگوی معناداری بین حضور ژن‌های مقاومت و توکسینی با میزان MIC سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* وجود دارد. در این مطالعه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کلاس مختلف و الگوی ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد سویه‌هایی که از نظر حضور ژن‌های پلاسمیدی مثبت بودند، بیشترین مقادیر MIC را به خود اختصاص داده بودند [۲۰].

## نتیجه‌گیری

وجود ارتباط بین میزان فراوانی ژن‌های پلاسمیدی *AmpC* و حداقل غلظت مهاری آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی مختلف می‌تواند این افزایش جهش بین سویه‌های حامل ژن‌های پلاسمیدی را محتمل‌تر سازد؛ این درحالی است که با استفاده از طیف گسترده‌تری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی می‌توان حداقل غلظت‌های مهاری را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین راه‌های تشخیص سویه‌های دارای برخی از ژن‌های عامل *AmpC* درنظر گرفت؛ ازاین‌رو، لازم است سویه‌های دارای مقاومت‌های چندگانه را از نظر محتمل‌بودن حضور ژن‌های کدکننده این آنزیم مورد توجه قرار داد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح دانشجویی می‌باشد که در سال ۱۳۹۵ (با شماره ۹۵۱۰۰۷۵۷۵۵؛ کد اخلاقی IR.UMSHA.REC.1395.402) با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند. شایان ذکر می‌باشد که هیچ‌گونه تعارض منافعی گزارش نگردیده است.

## REFERENCES


1. Japoni-Nejad A, Ghaznavi-Rad E, van Belkum A. Characterization of Plasmid-Mediated *AmpC* and carbapenemases among Iranain nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae using phenotyping and genotyping methods. *Osong Public Health Res Perspect*. 2014;**5**(6):333-8. PMID: 25562041 DOI: 10.1016/j.phrp.2014.09.003
2. Arabestani MR, Rajabpour M, Mashouf RY, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of Effulux Pump MexAB-OprM and OprD of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Clinical Samples using qRT-PCR. *Arch Iran Med*. 2015;**18**(2):102-8.
3. Rajabpour M, Alikhani MY. MIC determination of Pseudomonas aeruginosa strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). *Iran J Microbiol*. 2013;**7**(3):18-25. [Persian]
4. Fazzeli H, Faghri J, Kabiri P, Fatahibafghi M, Arabestani MR. Identification of beta-Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa with multiple antibiotic resistances. *J Isfahan Med School*. 2012;**29**(154):1365-74. [Persian]
5. Reuland EA, Halaby T, Hays JP, de Jongh DM, Snetselaar HD, van Keulen M, et al. Plasmid-mediated *AmpC*: prevalence in community-acquired isolates in Amsterdam, the Netherlands, and risk factors for carriage. *PLoS One*. 2015;**10**(1):e0113033. PMID: 25587716 DOI: 10.1371/journal.pone.0113033
6. Reuland EA, Hays JP, de Jongh DM, Abdelrehim E, Willemsen I, Kluytmans JA, et al. Detection and occurrence of plasmid-mediated *AmpC* in highly resistant gram-negative rods. *PLoS One*. 2014;**9**(3):e91396. PMID: 24642853 DOI: 10.1371/journal.pone.0091396
7. Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by *AmpC* hyperproduction in Pseudomonas aeruginosa clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;**49**(11): 4733-8. PMID: 16251318 DOI: 10.1128/AAC.49.11.4733-4738.2005
8. Japoni-Nejad A, Fardmusavi N, Safari M, Kazemian H, Tabibnejad M, Amuzandeh Nobaveh A, et al. Prevalence of plasmid-mediated *AmpC* ß-lactamase genes in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae in Arak City, Iran. *J Isfahan Med Sch*. 2013;**31**(249):1285-95. [Persian]
9. Tahmasebi H, Adabi J, Shahraki Zahedani S, Zeyni B. Comparison of two methods of direct PCR and PCR with DNA extracted by Kit for detection of OPrL, ExoA, and algD genes in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Qom Univ Med Sci J*. 2017;**11**(3):11-21. [Persian]
10. Adabi J, Shahraki Zahedani S, Bokaeian M, Tahmasebi H. An investigation of the prevalence of *AmpC*-producing Pseudomonas aeruginosa in clinical samples in Zahedan city, Iran. *Qom Univ Med Sci J*. 2017;**11**(4):61-71. [Persian]
11. Tam VH, Schilling AN, LaRocco MT, Gentry LO, Lolans K, Quinn JP, et al. Prevalence of *AmpC* over-expression in bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Clin Microbiol Infect*. 2007;**13**(4):413-8. PMID: 17359326 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01674.x
12. Wayne PA. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Wayne, PA: CLSI Document M100-S25, Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
13. Li Y, Li Q, Du Y, Jiang X, Tang J, Wang J, et al. Prevalence of plasmid-mediated *AmpC* β-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-type *AmpC* β-lactamase resistance in China. *J Clin Microbiol*. 2008;**46**(4):1317-21. PMID: 18305137 DOI: 10.1128/JCM.00073-07
14. Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K. Antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-Year Period. *PloS One*. 2015;**10**(10):e0139836. PMID: 26430738 DOI: 10.1371/journal.pone.0139836
15. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, Broutin I, Loeffert S, Fournier D, et al. Mutations in β-lactamase *ampc* increase resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;**59**(10):6248-55. PMID: 26248364 DOI: 10.1128/AAC.00825-15
16. Buchunde S, Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Comparison of disc and MIC reduction methods with polymerase chain reaction for the detection of metallo-beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa. *Indian J Med Microbiol*. 2012;**30**(2):170-4. PMID: 22664432 DOI: 10.4103/0255-0857.96683
17. Zhu B, Zhang P, Huang Z, Yan HQ, Wu AH, Zhang GW, et al. Study on drug resistance of Pseudomonas aeruginosa plasmid-mediated *AmpC* beta-lactamase. *Mol Med Rep*. 2013;**7**(2):664-8. PMID: 23241821 DOI: 10.3892/mmr.2012.1235
18. Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, Vidal C, Pérez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of β-lactam resistance mediated by *ampc* hyperproduction in Pseudomonas aeruginosa clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;**49**(11): 4733-8. PMID: 16251318 DOI: 10.1128/AAC.49.11.4733-4738.2005
19. Reuland EA, Hays JP, de Jongh DM, Abdelrehim E, Willemsen I, Kluytmans JA, et al. Detection and occurrence of plasmid-mediated *AmpC* in highly resistant gram-negative rods. *PLoS One*. 2014;**9**(3):e91396. PMID: 24642853 DOI: 10.1371/journal.pone.0091396
20. Hemati S, Azizi-Jalilian F, Pakzad I, Taherikalani M, Maleki A, Karimi S, et al. The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm formation in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Iran J Microbiol*. 2014;**6**(3):133-9. PMID: 25870745