

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 Tahmasebi¹, Mohammad Yousef Alikhani², Sanaz Dehbashi³, 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 Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁵ Associate Professor, 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

Abstract

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.

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, colicetin, 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 atterranum, 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*

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*}

^۱ کارشناس ارشد، گروه میکروپزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

^۲ استاد، گروه میکروپزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۳ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروپزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۴ دانشیار، گروه میکروپزشکی، 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 میکروپزشکی، همدان، ایران.

ایمیل: mohammad.arabestani@gmail.com

چکیده

سابقه و هدف: بتالاکتاماز نوع *AmpC* در گروه Amber Class C قرار می‌گیرد و شامل: *EBC*, *CIT*, *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.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی، حداقل غلظت مهاری ۹۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از نوارهای E-test آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفپودوکسیم، سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سپروفلوکساسین، کولیسیتین، آرترونوم 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 سفنازیدیم، ۸۷ ایزوله (۹۱/۵۷ درصد) به سفتریاکسون و ۲۲ ایزوله (۲۳/۱۵ درصد) به آرترونوم مقاومت داشتند؛ اما هیچ‌یک از ایزوله‌ها به کولیسیتین 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 معنادار بودن $P \leq 0.05$).

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

که قادر هستند آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز کنند و سبب بی‌اثر شدن این ترکیبات شوند [۱]. سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*)، یک باکتری گرم منفی است

امروزه، تولید بتالاکتامازها توسط پاتوژن‌های گرم منفی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مطرح است. بتالاکتامازها، آنزیم‌های باکتریایی می‌باشند

بیشتر آنزیم‌های *AmpC*، سفالوسپوریناز 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 *کلبرسیلا*، *اشریشیا کولی* و گونه‌های مختلفی از *سودوموناس* و *آسینتوباکتر منتقل گردید [۵]*.

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

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، در بازه زمانی دی ماه ۱۳۹۵ تا تیر ماه ۱۳۹۶ طی 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 سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم) / کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم) در فاصله ۳۰ میلی‌متری از دیسک سفنازیدیم (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 در صورت وجود اختلاف قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی با اسید کلاولانیک با قطر هاله عدم رشد دیسک فاقد اسید کلاولانیک به

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 ضد میکروبی مقاومت ذاتی دارد. مشکل مقاومت ذاتی این باکتری با بروز مقاومت اکتسابی رو به گسترش نسبت به عوامل ضد میکروبی که به‌طور معمول دارای فعالیت علیه این پاتوژن هستند، همراه می‌باشد [۳]. این پاتوژن در کنار باکتری‌هایی مانند *اشریشیا کولی* (*Escherichia coli*)، *کلبرسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*) و *آسینتوباکتر بومانی* (*Acinetobacter baumannii*) می‌تواند زمینه‌ساز عفونت‌های بیمارستانی در بیماران بستری در بیمارستان‌ها شود. علاوه بر این، 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. بتالاکتام‌های 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. بتالاکتام‌های نوع *AmpC* در اواخر دهه ۱۹۷۰ ظاهر شده و مورد بررسی قرار گرفت. این آنزیم‌ها، سفالوسپورین‌های با دامنه وسیع مانند سفنازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم و مونوباکتام‌هایی مانند آزترونام و سفامایسین‌ها را هیدرولیز می‌نمایند و توسط مهارکننده‌های معمولی مانند کلاولانات مهار نمی‌شوند [۵]. در اواخر دهه ۱۹۸۰ این ژن‌های کروموزومی قابل القا روی پلاسمیدهای ارگانسیم‌هایی که به‌طور ذاتی این نوع بتالاکتام‌ها را بیان نمی‌کردند، ظاهر شدند. مطالعه در ارتباط با بتالاکتام‌های 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 بتالاکتام 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]. افزون بر این، 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

استفاده از پرایمرهای موجود در جدول ۱ و همچنین تکنیک Multiplex با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۲ میکرولیتر از پلاسمید، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۱/۵ میکرولیتر از ماستر 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 ۱۰ دقیقه انجام شد. در ادامه، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز رنگ‌آمیزی‌شده با Gel Red (ساخت شرکت Biotium، کشور آمریکا) ۲/۵ درصد الکتروفورز گردید. در نهایت، 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 $(P \leq 0.05)$ به‌عنوان شاخص معنادار بودن در نظر گرفته شد.

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 در نظر گرفته می‌شد [۱۱].

از سوی دیگر، حداقل غلظت مهاری برای آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفپودوکسیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سیپرو-فلوکساسین، کولیسیتین، آزترئونام و سفتریاکسون 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. بدین ترتیب 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 برات (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 پلی‌مرز (PCR) با

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 MOXMR	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	۵۲۰	D13304	[۱۳]
CIT	CITMF CITMR	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	۴۶۲	X78117	[۱۳]
DHA	DHAMF DHAMR	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	۴۰۵	Y16410	[۱۳]
EBC	EBCMF EBCMR	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	۳۰۲	M37839	[۱۳]
FOX	FOXMF FOXMR	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	۱۹۰	X77455	[۱۳]
ACC	ACCMF ACCMR	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	۳۴۶	AJ133121	[۱۳]

یافته‌ها

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

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 کاتتر، ۱۰

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

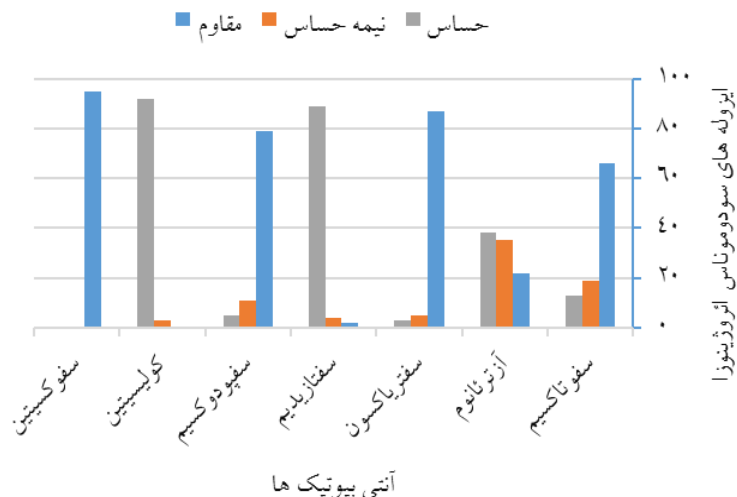
جنسیت	سودوموناس آئروژینوزا (n=۹۵)	
	AmpC (n=۴۹)	ESBL (n=۹۱)
زن	۴۰ (۸۱/۲۳)	۷۰ (۷۶/۹۲)
مرد	۹ (۱۸/۳۶)	۲۱ (۲۳/۰۷)

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).

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

حداقل غلظت مهاري بیشتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به سفوتاکسیم، ۲۲ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاري بیشتر از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به آزترنانوم، ۸۷ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاري بیشتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به سفتریاکسون، ۲ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاري بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقاوم به سفنازیدیم و ۹۵ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاري 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 مهاري ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند که به عنوان نیمه‌حساس در نظر گرفته شدند (شکل ۱) (جدول ۳).

با بررسی‌های انجام شده 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)



شکل ۱: حداقل غلظت مهاري ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

بحث

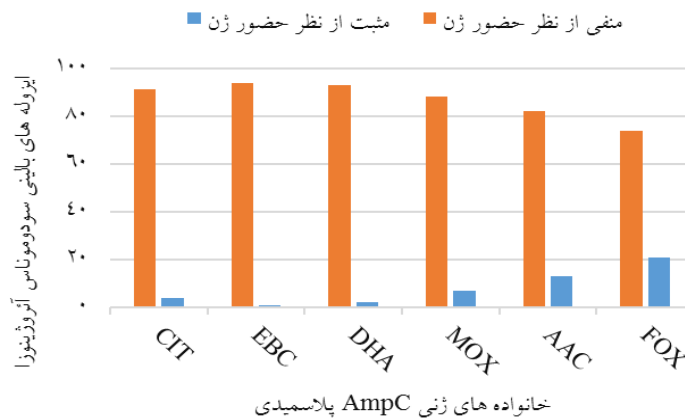
و سفالوسپورین‌ها (به جز سفپیروم و سفپیم) می‌گردد. *AmpC* به واسطه پلاسمید در میان بسیاری از جدایه‌های بالینی (به ویژه خانواده انتروباکتریاسه) منتشر شده و معضلات فراوانی را در جهت ظهور سویه‌های دارای مقاومت‌های گسترده و چندگانه به

مقاومت به بتالاکتام‌ها به واسطه حضور آنزیم *AmpC* بتالاکتام‌زای، یکی از مهم‌ترین چالش‌های بخش بالینی به شمار می‌رود. این آنزیم که به طور طبیعی توسط تعدادی از باکتری‌ها گرم منفی تولید می‌شود، سبب ایجاد مقاومت به پنی‌سلین‌ها

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																						
	سفتوتاکسیم			آزترنوم			سفترباکسون			سفتازیدیم			سفیووکسیم			کولستین			سفوکسیتین			کل	
	S*	I*	R*	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	ژن‌ها	
FOX	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۱
AAC	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۳
MOX	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۷
DHA	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲
EBC	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
CIT	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۴

R: Resistant
I: Intermediate
S: Sensitive



شکل ۲: فراوانی خانواده‌های 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

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

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* طی سال‌های اخیر، به دلیل فعالیت‌های این گروه‌های تنظیمی به شدت 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 مهارتی در سویه‌های دارای ژن‌های پلاسمیدی *AmpC* تفاوت چشمگیری با سویه‌های فاقد این ژن‌ها ندارد [۱۹]؛ این در حالی بود که در این مطالعه ارتباط معناداری بین الگوی حداقل غلظت مهارتی و ژن‌های عامل تولید آنزیم *AmpC* مشاهده گردید؛ به طوری که ایزوله‌های دارای ژن‌های عامل *AmpC* از بیشترین مقادیر MIC برخوردار بودند. علاوه بر این، ایزوله‌های فاقد گروه‌های ژنی *AmpC* در تمامی موارد به لحاظ مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، فاقد مقامت بودند؛ به طوری 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 مهارتی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی مختلف می‌تواند این افزایش جهش بین سویه‌های حامل ژن‌های پلاسمیدی را محتمل‌تر سازد؛ این در حالی است که با استفاده از طیف گسترده‌تری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی می‌توان حداقل غلظت‌های مهارتی را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین راه‌های تشخیص سویه‌های دارای برخی از ژن‌های عامل *AmpC* در نظر گرفت؛ از این رو، لازم است سویه‌های دارای مقاومت‌های چندگانه را از نظر محتمل بودن 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 منافی گزارش نگردیده است.

بیمارستان می‌تواند مسیر درمان را با مشکل مواجه سازد. نتایج به‌دست آمده از تعیین حداقل غلظت مهارتی آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفوپودوکسیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سیپرو-فلوکساسین، کولیسیتین و آرترونوم در مطالعه حاضر با یافته‌های مطالعه‌ای که پایان و همکاران در سال ۲۰۱۵ در آلمان انجام دادند، مطابقت داشت؛ به طوری 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 آرترونوم و سفتازیدیم به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان مقاومت در بین سویه‌های مورد بررسی بودند. علاوه بر این، 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 آرترونوم 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 جدا شده 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].

علاوه بر این، مطالعات ژنتیکی خانواده‌های ژنی *AmpC* پلاسمیدی نشان داد که بیشترین شیوع ژنی مربوط به ژن‌های *FOX* و *AAC* می‌باشد؛ این در حالی 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 در مجموع، 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 ذکر شده همخوانی دارد [۱۷]. در بسیاری از مطالعات صورت گرفته 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 بالا بودن مقادیر حداقل غلظت مهارتی سویه‌های

REFERENCES

- 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
- Arabestani MR, Rajabpour M, Mashouf RY, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of Efflux Pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Samples using qRT-PCR. *Arch Iran Med*. 2015;18(2):102-8.
- 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]
- 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]
- 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
- 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
- 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
- Japoni-Nejad A, Fardmusavi N, Safari M, Kazemian H, Tabibnejad M, Amuzandeh Nobaveh A, et al. Prevalence of plasmid-mediated *AmpC* β -lactamase genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Arak City, Iran. *J Isfahan Med Sch*. 2013;31(249):1285-95. [Persian]
- 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]
- 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]
- 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
- 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.
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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