مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۳، پاییز ۹۷، صفحات ۲۱۲ تا ۲۱۹

Original Article

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های بالینی *Pseudomonas aeruginosa* و ردیابی ژن *AmpC* در آنها

مهسا جمشیدی گهر[۱]، ناهید رحیمی فرد[۲]، سید رضا حسینی دوست[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبشناسی، علوم پزشکی تهران ، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران
[۲]دانشیار، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
[۳]استاد، گروه میکروب شناسی، علوم پزشکی تهران ، دانشگاه آزاداسلامی ، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *علیرغم پیشرفت‌های ایجاد شده در امر مراقبت بیمارستانی و معرفی طیف گسترده‌ای از عوامل ضد میکروبی، باکتری سودوموناس آئروژینوزا هم‌چنان از عوامل شایع ایجاد کننده عفونت در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان است. با توجه به مقاومت روزافزون این باکتری به داروهای ضدباکتریایی، اهمیت مقاومت آن دوچندان می‌شود. آنزیم AMP-C بتالاکتامازی، از جمله سفالوسپورین‌هایی است که بر روی کروموزوم باکتری کد می‌شود. در بسیاری از باکتری‌ها، القای آنزیم‌های AMP-C می‌تواند در سطح بالا توسط جهش های فراوان صورت گیرد. در این مقاله ردیابی ژن AMP-C در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا گزارش شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه، ۸۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی زخم، پس از تایید هویت ایزوله‌ها با تست‌های بیوشیمیایی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها با روش استاندارد دیسک دیفیوژن نسبت به ۱۵ آنتی بیوتیک تعیین شد و در پایان حضور ژن AMP-C با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ردیابی شد.*

یافته‌ها: *سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا بیشترین مقاومت را به نسبت به سفالوتین (۱۰۰درصد)، داکسی سایکلین (۱۰۰ درصد)، سفکسیم (۱۰۰ درصد)، آموکسی سیلین (۱۰۰درصد)، آمپی سیلین (۱۰۰درصد)، آمیکاسین (۱۰۰درصد) و تری متوپریم (۱۰۰درصد) نشان دادند. بیشترین حساسیت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب به آنتی‌بیوتیک‌های کولیستین (۶۷/۵درصد)، جنتامایسین (۳۲/۵ درصد)، پیپراسیلین (۳۰درصد)، سیپروفلوکساسین (۲۸/۷ درصد)، ایمی پنم (۱۸/۷ درصد)، سفتازیدیم (۱۳/۷درصد) ،سفتریاکسون (۱۱/۲ درصد) و سفوتاکسیم (۱۰ درصد) بود. ژن AMP-C در پنج درصد ایزوله‌ها ردیابی شد.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به نتایج این مطالعه، در بسیاری از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مورد بررسی، حضور همه ژن‌های عامل مقاومت در یک ایزوله مشاهده نشد. بنابراین، می‌توان امید داشت که آنزیم‌های بتالاکتامازی با حداکثر توان در بیشتر ایزوله‌ها کد نمی‌شوند.*

واژگان کلیدی: *ژن AMP-C، مقاومت آنتی بیوتیکی، Pseudomonas aeruginosa، ایزوله بالینی.*

مقدمه

Pseudomonas aeruginosa باسیل گرم منفی، هوازی، غیر تخمیری، بدون اسپور و دارای تاژک و کاتالاز و اکسیداز مثبت است. این باکتری به وفور در بخش‌های مختلف اکوسیستم زندگی می‌کند. انواع محیط‌ها مثل بیمارستان، وسایل پزشکی، پرستاران و سایر پرسنل بیمارستان به آسانی با *P.aeruginosa* کلونیزه می‌شوند (۱, ۲). *P. aeruginosa* در محیط کشت یا بدن انسان رنگ‌دانه‌های مختلفی مثل پیوسیانین تولید می‌کند که احتمالا در روند بیماری‌زایی آن موثر هستند (۳). *P.aeruginosa* دارای انواع مختلفی از فاکتورهای خارج سلولی است که در بیماری‌زایی آن نقش دارند. تولید توکسین،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، سید رضا حسینی دوست (**email**: rhdoust@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۲/۱۷

آنزیم‌های متنوع، پروتئازها و دارا بودن پیلی،فلاژل و لیپوپلی ساکارید وتولید کپسولی از جنس آلژینات از جمله عوامل مهم بیماریزایی این ارگانیسم محسوب می‌شوند (۴). *P.aeruginosa* یکی از گونه‌های مهم *Pseudomonas* است که در غالب یک پاتوژن فرصت طلب در اندام و اعضاء مختلف انسان، در گروه‌های گوناگون سنی و جنسی عفونت ایجاد می‌کنند. در بعضی از بخش‌های بیمارستانی همچون بخش سوانح سوختگی و بخش آی سی یو *P. aeruginosa* مهم‌ترین عامل عفونی است (۵). مشکل عمده عفونت‌های *P.seudomonas* مقاومت آنتی بیوتیکی آنها است. گزارش‌ها از روند رو به گسترش مقاومت های دارویی حکایت می‌کنند که مانع بزرگی بر سر پیشگیری و درمان عفونت‌های ناشی از *P.seudomonas* محسوب می‌شوند (۶,۷).

P. aeruginosa به طور ذاتی به پنی سیلین‌های طیف باریک، نسل اول و دوم سفالوسپورین‌ها، تری متوپریم و سولفونامیدها مقاوم است (۸). مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* به ترکیبات بتالاکتام که از گذشته شروع شده است، امروزه با سرعت باور نکردنی رو به افزایش است (۹). الگوی مقاومت دارویی در گونه‌هایی که در دوره‌های زمانی متفاوت بررسی می‌شوند و همین طور جدایه‌های منابع مختلف مثل ایزوله‌های آب، فاضلاب، خاک و ..... وحتی مناطق مختلف جغرافیایی و کشورها و شهرهای گوناگون نوسان‌هایی را نشان داده است (۱۰).

بتالاکتامازهای نوع AmpC در اواخر دهه ۱۹۷۰ ظاهر و مورد مطالعه قرار گرفتند. این آنزیم‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع الطیف مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام‌هایی مانند آزترونام و سفامایسین‌ها را هیدرولیز می‌کنند، اما توسط مهار کننده‌های معمولی مانند کلاوولانات مهار نمی‌شوند (۱۱،۱۲). در اواخر دهه ۱۹۸۰، این ژن‌های کروموزومی قابل القا، بر روی پلاسمیدها ظاهر شده و به باکتری‌هایی که فاقد این ژن‌ها بودند منتقل شدند. مطالعه بر روی بتالاکتامازهای نوع AmpC از اواخر دهه ۱۹۷۰ شروع شد (۱۳،۱۴). آنزیم‌های AmpC که اغلب قابل القا توسط بتالاکتام‌ها هستند، به وسیله ژن‌های کروموزومی کد شده و در بسیاری از باسیل‌های گرم منفی نیز وجود دارند. آنزیم AmpC نسبت به مهار با اسیدکلاولانیک مقاوم است و از نظر بیولوژیکی می‌تواند نسبت به سفامایسین و اکسیآمینوبتالاکتام نیز مقاومت پیدا کند (۱۵). بیشتر آنزیم‌های AmpC، سفالوسپورینازها هستند، ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها نظیر پنی سیلین‌ها را نیز دارند (۱۶،۱۷). در اواخر دهه ۱۹۸۰، ژن‌های کروموزومی قابل القا روی پلاسمید آشکار شدند و به سایر باکتری‌های فاقد آنها نظیر سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا، اشرشیاکلی و یا گونه‌های سالمونلا انتقال یافتند (۱۸). با توجه به اهمیت ظهور آنزیم‌های بتالاکتامازی نوع AmpC، همچنین گردش ژن‌های عامل این آنزیم در سودوموناس آئروژینوزا که باعث شکل گیری سویه‌های جدید در این باکتری شده است، ضرورت مطالعه در این زمینه بیشتر حس می‌شود. در مطالعه حاضر، آخرین وضعیت الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی *P. aeruginosa* و فراوانیAmpC بررسی و با سایریافته‌های مطالعاتی مقایسه و تحلیل شد.

مواد و روشها

در مطالعه توصیفی–تحلیلی حاضر که از نوع مقطعی است، ایزوله‌های *P. aeruginosa* جمع آوری شده از بیمارستان سوانح سوختگی مطهری استان تهران ارزیابی شدند. جامعه مورد بررسی کلیه سویه‌های *P. aeruginosa* به دست آمده از بیماران بستری در بیمارستان سوانح سوختگی مطهری استان تهران بود که از اسفند ۱۳۹۵ تا اردیبهشت ۱۳۹۶جمع آوری شده بودند.

تعداد ۸۰ ایزوله *P. aeruginosa* از نمونه‌های بالینی زخم از آزمایشگاه‌های بیمارستان مطهری جمع آوری شد. ایزوله‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه باکتری شناسی در محیط کشت مک کانکی آگار کشت داده شدند و کلنی‌های ایزوله شده به روش‌های بیوشیمیایی مانند اکسیداز، OF و رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد تعیین هویت شدند. تعیین حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک‌ها مطابق استاندارد CLSI انجام شد. نوع محیط کشت، در اندازه هاله عدم رشد و میزان نفوذ آنتی بیوتیک نقش به سزایی دارد.

پس از مرحله کشت، دیسک‌های آنتی بیوتیکی محصول شرکت Rosco، شامل آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، پیپراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، داکسی سایکلین (۳۰میکروگرم)، سفکسیم (۵میکروگرم)، تری متوپریم (۵میکروگرم)، کولیستین (۱۰میکروگرم) و سفتریاکسون (۳۰میکروگرم) بر روی محیط به صورت دایره‌ای با رعایت

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین حضور ژن AMP-C

طول محصول	Sequence	پرایمر	ژن هدف
24mer	GGTGCTGAAGGACCAGGCACAGAT	AMP-C -F	AMP-C
	CGTTGCTCGGGTTGGAATAGAGGC	AMP-C -R	

فاصله مناسب و استاندارد از یکدیگر (۱۲ میلی متر) و با فاصله از لبه پلیت قرارداده شدند. دیسک‌های ذخیره در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و دیسک‌های مصرفی در یخچال در ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. دیسک‌های مورد نظر را ۱ تا ۲ ساعت قبل از انجام آزمایش از یخچال بیرون آورده تا به دمای اتاق برسند و پس از مصرف بلافاصله به یخچال برگردانده شدند.

پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۳ ساعت گرماگذاری شدند. پس از دوره انکوباسیون، در زیر چراغ قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد و با مقایسه آن با جداول استاندارد CLSI تحت عناوین حساس (Sensitive)، نیمه حساس (Intermediate) و یا مقاوم (Resistant) گزارش شد. جهت کنترل از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 استفاده شد.

از روش میکروپلیت برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی MIC میکروارگانیسم‌های موجود در مطالعه استفاده شد. این تست برای آن دسته از باکتری‌ها انجام می‌شود که نسبت به آنتی بیوتیک مورد نظر حساس هستند و هاله عدم رشد مشاهده می‌شود. در این روش ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتیک سوی آگار TSB در هر یک از خانه‌ها ریخته شد، سپس برای آنتی بیوتیک ابتدا در خانه اول هر ردیف افقی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر ریخته شد و بعد از مخلوط کردن با محیط TSB، ۱۰۰ میکرولیتر از خانه اول برداشته شد و در Well بعدی ریخته شد و بعد از مخلوط کردن با محیط کشت TSB، ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شد و به Well بعدی ریخته شد و این کار را تا خانه هشتم از ردیف افقی ادامه یافت و از Well آخر ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر یک از Wellهای هر ردیف اضافه شد. به این ترتیب در هر ردیف یک نوع میکروب وجود داشت و در هر Well به ترتیب غلظت‌های ۱۲۵،۲۵۰، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹، ۱/۹۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حاصل شد.

این کار برای هر ۸ آنتی بیوتیک ایمیپنم، کولیستین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، و پیپراسیلین و هر ۱۷۰ میکروب سودوموناس آئروژینوزای حساس و سودوموناس آئروژینوزای استاندارد هم انجام شد. در انتها میکروپلیت‌ها درون انکوباتور و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت شدند. نتایج از سمت چاهک با بیشترین غلظت آنتی بیوتیکی به سمت چاهک با کمترین غلظت خوانده شد. آخرین چاهک شفاف نشان‌دهنده MIC است.

قبل از انجام تست PCR، لازم است که ژنوم سوش‌های باکتریایی مورد نظر به روش استاندارد استخراج شود. جهت استخراج DNA از ایزوله‌های بالینی از روش جوشاندن استفاده شد. ابتدایک لوپ از سلول‌های هر تک کلنی نمونه، داخل ویال اپندورف ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل با استفاده از میکسر حل شد. سپس ویال به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه داخل بن ماری جوش قرار داده شد، به طوری که سطح آب جوش دو سوم ویال را در بر گرفت. سپس ویال‌ها به مدت ۶ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ rpm در میکروسانتریفیوژ، سانتریفیوژ شدند. محلول رویی برای انجام واکنش PCR به اپندورف استریل منتقل شد.

پرایمرهای مورد نیاز از شرکت تکاپوزیست تهیه شد. جهت تکثیر از ژن Ampc، از یک جفت پرایمر که سکانس آنها در جدول ۱ ذکر شده است، استفاده شد (۱۴).

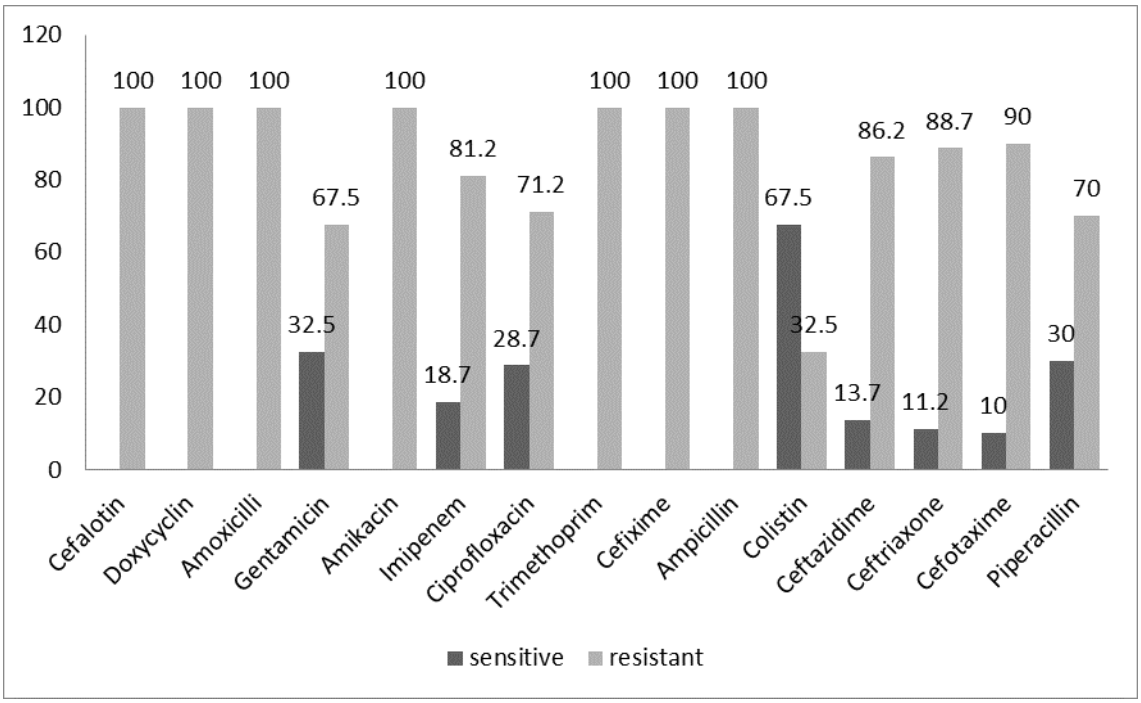
برای انجام این واکنش، طبق دستورالعمل PCR، به ازای هر نمونه یک حجم ۲۵ میکرولیتری از مواد مختلف تهیه شد و ۲ میکرولیتر نمونه DNA تخلیص شده مورد نظر به آن اضافه شد. به این صورت که در شرایط کاملا آسپتیک و زیر هود، برای هر نمونه، مواد به ترتیب و مطابق مقادیر ذکر شده در جدول ۲ به میکروتیوب‌ها اضافه (هر جفت پرایمر به صورت مستقل اضافه و PCR شد) و سپس توسط شیکر مخصوص PCR به مدت چند ثانیه در دور پایین شیک شدند تا به خوبی با هم مخلوط شوند (آنزیمTaq در مرحله آخر اضافه شد)؛ سپس ۲µl از DNA تخلیص شده به محتویات درون میکروتیوب‌ها که قبلا شماره نمونه‌ها روی درپوش آنها نوشته شده بود، اضافه شد و دوباره کل محتویات اپندورف شیک شد. در این مرحله ۲µl روغن مخصوص روی سطح مخلوط ریخته شد تا از بخار شدن نمونه‌ها پس از عمل PCR جلوگیری کند (بعد از اضافه کردن روغن، عمل شیک نباید انجام شود تا

جدول ۲. مواد مورد استفاده برای تهیه Master mix

اجزای واکنش PCR	مقدار مواد برای یک نمونه
آب gradePCR	۲۰/۲۵میکرولیتر
$MgCl_2$	۰/۵ میکرولیتر
dNTP	۰/۵ میکرولیتر
DNA polymerase reaction buffer	۲/۵ میکرولیتر (10X)
Taq DNA Polymerase	۲/۵ میکرولیتر
پرایمر Forward	۰/۵ میکرولیتر
پرایمرReverse	۰/۵میکرولیتر
DNA الگو	۲ میکرولیتر
حجم نهایی بدون DNA الگو	۲۵ میکرولیتر

جدول ۳. به مراحل چرخه حرارتی برای ژن AMPC

Final extention	۳۰ step cycles			Primary denaturation
۷۲ درجه سانتی‌گراد	Extention	Annealing	Denaturation	۹۴ درجه سانتی‌گراد
۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۶۵ درجه سانتی‌گراد	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه
	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	



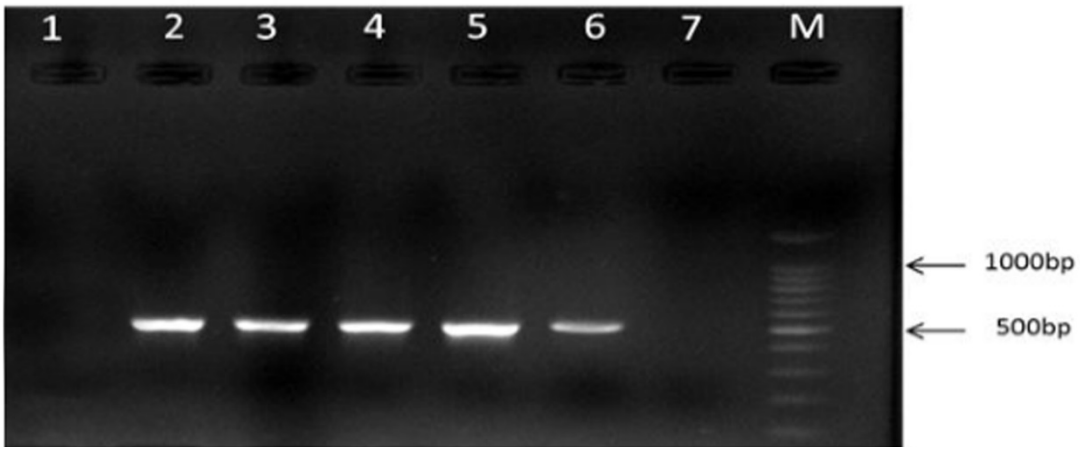
نمودار ۱. درصد مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیک های موثر بر *P. aeruginosa*

روغن با حجم مورد نظر مخلوط نشود و روی سطح بماند). سپس اپندورف‌ها درون دستگاه PCR قرار داده شدند (۱۴).

طبق برنامه جدول ۳ که برای سیکل‌های حرارتی ژن‌ها روی دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد، عمل PCRانجام شد. پس از به اتمام رسیدن PCR، نمونه‌ها تا زمان الکتروفورز در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۱۴). در این مرحله نمونه ژنوم PCR شده روی ژل آگارز لود و الکتروفورز شدند و از لحاظ دارا بودن ژن AMPC مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

نمونه برداری از ۸۰ بیمار دارای زخم سوختگی مراجعه کننده به بیمارستان انجام پذیرفت.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن Ampc بر روی ژل آگارز ۱ درصد

نتایج آنتی‌بیوگرام ایزوله‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در جدول ۴ ملاحظه می‌شود. همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا بیشترین مقاومت را به نسبت به سفالوتین (۱۰۰درصد)، داکسی سایکلین(۱۰۰ درصد)، سفکسیم(۱۰۰ درصد)، آموکسی سیلین (۱۰۰درصد)، آمپی سیلین (۱۰۰درصد)، آمیکاسین(۱۰۰درصد) و تری متوپریم (۱۰۰درصد) نشان دادند. بیشترین حساسیت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب به آنتی بیوتیک‌های کولیستین (۶۷/۵درصد)، جنتامایسین (۳۲/۵ درصد)، پیپراسیلین (۳۰درصد)، سیپروفلوکساسین (۲۸/۷ درصد)، ایمی پنم (۱۸/۷ درصد)، سفتازیدیم (۱۳/۷درصد)، سفتریاکسون (۱۱/۲ درصد) و سفوتاکسیم (۱۰ درصد) بود. ایزوله‌ها نسبت به هیچ آنتی بیوتیکی مقاومت حدواسط (Intermediate) نداشتند (نمودار ۱). ردیابی ژن AMP-C در ایزوله‌های بالینی در شکل ۱دیده می‌شود. مطابق جدول ۵، پنج درصد جدایه‌ها بالینی از نظر دارا بودن ژن AMP-C مثبت بودند.

شکل ۱ نتایج PCR چند نمونه مثبت و منفی از نظر ژن AMPC را روی ژل نشان می‌دهد. نمونه‌ها درون چاهک‌ها به این صورت لود شده‌اند: چاهک MDNA مارکر 1000bp (DNA Ladder)، چاهک۶ نمونه AMPC مثبت به عنوان شاهد(500bp)، چاهک ۷ نمونه AMPC منفی به عنوان شاهد، چاهک ۱ نمونه DNA AMPC منفی تخلیص شده از ایزوله ها، چاهک‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ نمونه‌های DNA AMPC مثبت تخلیص شده از ایزوله‌ها.

جدول ۴. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های دارای ژن Ampc در *P. aeruginosa*

آنتی بیوتیک	غلظت	AMPC (+)			
		68	29	12	5
Cefalotin	۳۰µg	R	R	R	R
Doxycyclin	۳۰µg	R	R	R	R
Amoxicilli	۲۵µg	R	R	R	R
Gentamicin	۱۰µg	R	R	R	R
Amikacin	۳۰µg	R	R	R	R
Imipenem	۱۰µg	R	R	R	R
Ciprofloxacin	۵µg	R	S	R	S
Trimethoprim	۵µg	R	R	R	R
Cefixime	۵µg	R	R	R	R
Ampicillin	۱۰µg	R	R	R	R
Colistin	۱۰µg	R	R	S	S
Ceftazidime	۳۰µg	R	S	S	R
Ceftriaxone	۳۰µg	R	R	R	R
Cefotaxime	۳۰µg	R	R	R	R
Piperacillin	۱۰۰µg	S	R	R	S

جدول ۵. نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز ژن AMPC در۸۰ ایزوله P. aeruginosa

ژن	تعداد نمونه ها	درصد
دارای ژنAMPC	۴	۵
فاقد ژن AMPC	۷۶	۹۵

بحث

امروزه، تولید بتالاکتامازها توسط پاتوژن‌های گرم منفی، یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام است. بتالاکتامازها، آنزیم های باکتریایی هستند که قادرند آنتی

بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز کرده و سبب بی اثر شدن این ترکیبات شوند (۱۹). در مطالعه‌ای که رائفی و همکارانش بر روی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند، آنزیم Ampc در این ایزوله‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت که حدود ۵ درصد از همه ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای همه ژن‌های گروه Ampc بودند که این نتایج با یافته مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۰). عدم وجود شباهت در نتایج به دست آمده در این تحقیق با مطالعات دیگر را می‌توان به تغییر سویه متناسب با موقعیت جغرافیایی نسبت داد، به طوری که حتی در برخی موارد ممکن است گزارش‌های ارائه شده از بیمارستان‌های مختلف یک شهر نیز کاملا با هم متفاوت باشند که این موضوع اهمیت وجود مطالعات مداوم و گسترده را نشان می‌دهد (۲۱). از طرفی، تعداد ارگانیسم‌های قادر به تولید آنزیم‌های Ampc، در سویه‌های سودوموناس در حال گسترش است که این امر به عنوان یکی از مهم‌ترین مسائل در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری مطرح است. علاوه بر این، در گزارش‌های به دست آمده از ایران، اشاره کمتری به حضور آنزیم Ampc در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد که همه این موارد، حاکی از نیاز به مطالعه بیشتر بر روی ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع Ampc است (۲۲).

بتالاکتامازهای نوع AmpC در اواخر دهه ۱۹۷۰، ظاهر و مورد مطالعه قرار گرفتند. این آنزیم‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع الطیف مانند سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام‌هایی مانند آزترونام و سفامایسین ها را هیدرولیز می‌کنند، اما توسط مهار کننده‌های معمولی مانند کلاوولانات مهار نمی‌شوند (۲۳،۲۴). در اواخر دهه ۱۹۸۰، این ژن‌های کروموزومی قابل القا بر روی پلاسمیدها ظاهر شده و به باکتری‌هایی که فاقد این ژن‌ها بودند منتقل شدند. مطالعه بر روی بتالاکتامازهای نوع AmpC از اواخر دهه ۱۹۷۰ شروع شد (۲۵). بیشتر آنزیم‌های AmpC، سفالوسپورینازها هستند، ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها نظیر پنی سیلین‌ها را نیز دارند (۲۶).

در بررسی فراوانی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در ایزوله‌های *P.aeruginosa* از زخم‌های سوختگی در بیمارستان سوانح سوختگی یزد در سال ۱۳۹۱، ۲۹/۵ درصد دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند (۲۷). در مطالعه احدی و همکارانش در سال ۱۳۹۱ که روی ۱۰۰ نمونه سودوموناس آئروزینوزای جداشده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های استان اصفهان انجام شد، میزان مقاومت سویه‌ها به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۵۶ درصد، جنتامایسین ۵۹ درصد، ایمیپنم ۵۵ درصد، سفپیم ۵۵ درصد، سفتازیدیم ۵۷ درصد، سفتریاکسون ۶۰ درصد، سفوتاکسیم ۶۲ درصد و پیپراسیلین ۴۸ درصد بود (۲۸)، در حالی که در مطالعه ما مقاومت به تمامی آنتی بیوتیک‌ها بالاتر بود.

در مطالعه حاضر ۵ درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن Ampc بودند. مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها یک مشکل جدی در بیمارستان‌های سوختگی و بخش مراقبت‌های ویژه است که استفاده از آنتی بیوتیک‌های با طیف محدود و انجام آنتی بیوگرام قبل از استفاده از آنتی بیوتیک توصیه می‌شود. با توجه به نتایج این مطالعه، در بسیاری از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مورد بررسی، حضور همه ژن‌های عامل مقاومت در یک ایزوله مشاهده نشد؛ بنابراین، می‌توان امید داشت که آنزیم های بتالاکتامازی با حداکثر توان در بیشتر ایزوله‌ها کد نمی‌شوند. با همه این موارد باید سعی شود تا از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها جلوگیری و آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف بدون معاینه دقیق و بررسی‌های آزمایشگاهی حساس تجویز نشوند تا بتوان شاهد کاهش و کنترل مقاومت بود.

REFERENCES

1. Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009;58:1133-48.

2. Lambert P A. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. J R Soc Med 2002;95:22-6.

3. Reza Hosseini Doust, Mehdi Saberi, Mohamad Javad Hosseini, Ashraf Mohabati Mobarez. Surveillance of current antibiotic resistance among clinical isolates S. aureus, E. coli and P. aeroginosa collected from five Iranian cities. JPHS 2013;1:175-83.

4. Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, Alhede M. Pseudomonas aeruginosa biofilms: mechanisms of immune evasion. Adv Appl Microbiol 2014;86:1-40.

5. Johnson JK, Smith G, Lee MS, Venezia RA, Stine OS, Nataro JP, et al. The Role of Patient-to-Patient Transmission in the Acquisition of Imipenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa Colonization in the Intensive Care Unit. J Infect Dis 2009;200:900-5.

6. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial Resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clin Microbiol Rev 2009;22:582-610.

7. Balasubramanian D, Schneper L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, et al. The Regulatory Repertoire of Pseudomonas aeruginosa AmpC ß-Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. Plos One 2012;7:e34067.

8. Chen SSP. Pseudomonas Infection Medication. In: Steele RW, ed. Medscape. Available in: https://emedicine.medscape.com/article/970904-overview. [Updated: Jul 25, 2017]

9. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev 2006;19:403-34.

10. Nazari Monazam A, Hosseini Doust SR, Mirnejad R. Prevalence Per and VEB beta-lactamase genes among Acinetobacte baumanni isolated from patients in Tehran by PCR. Iran J Med Microbiol 2014;8:28-35.

11. Bermudes H, Arpin C, Jude F, El Harrif Z, Bébéar C, Quentin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16:523-9.

12. Filloux A, Ramos JL. Pseudomonas methods and protocols. New York: Humana Press; 2014.

13. Aghazadeh M, Hojabri Z, Mahdian R, Nahaei MR, Rahmati M, Hojabri T, et al. role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY(-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis and burn patients. Infection, genetics and evolution. Infect Genet Evol 2014;24:187-92.

14. Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents 2012;40:168-72.

15. 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;13:413-8.

16. Soleimani N, Aganj M, Ali L, Shokoohizadeh L, Sakinc T. Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic E. coli isolated from Iranian hospital. BMC Res Notes 2014;7:842.

17. Babaii Kochaksaraii M, NasrolahiOmran A, Javid N, Shakeri F, Yazdi M, Ghaemi EA. Extended spectrum beta lactamase producing E. coli isolated from Gorgan, North of Iran. Med Lab J 2012;6:51-8.

18. Gomez MG, Carrión LG, Vilar B, Pijoán JI, Hernández JL, José Miguel Montejo Baranda. Bacteriemias por enterobacterias productoras de beta-lactamasas (BLEE, AmpC y carbapenemasas) asociación con los cuidados sanitarios y los pacientes oncológicos. Revista Española de Quimioterapia 2015;28:256-62.

19. Chance DL, Mawhinney TP. Carbohyrate sulfation effects on growth of Pseudomonas aeruginosa. Microbiology 2000;146:1717-25.

20. Rafiee R, Eftekhar F, Tabatabaei SA, Minaee Tehrani D. Prevalence of Extended-spectrum and Metallo BetaLactamase production in AmpC Beta-Lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolates from burns. Jundishapur J Microbiol 2014;7:e16436.

21. Wassef M, Behiry I, Younan M, El Guindy N, Mostafa S, Abada E. Genotypic Identification of AmpC Beta-lactamases production in gram-negative bacilli isolates. Jundishapur J Microbiol 2014;7:e8556.

22. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the hodge test and imipenem- EDTA Double disk synergy test for differentiating metallo bata lactamase producing isolates of Pseudomonas spp and Acinetobacter spp. J Clin Microbiol 2003;41:4623-9.

23. Hackman HK, Osei Adjei G, Gordon A, Laryea E, Quaye S, Anison L, et al. Phenotypic Characterization of AmpC beta-lactamase among Cefoxitin Resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Isolates in Accra, Ghana. J Biolo Agric Health 2013;3:102-6.

24. Bermudes H, Arpin C, Jude F, El Harrif Z, Bébéar C, Quentin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16:523-9.

25. Filloux A, Ramos JL. Pseudomonas methods and protocols. New York: Humana Press; 2014.

26. Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents 2012;40:168-72.

27. Nazari A, Hosseini Doust R, Mirnejad R. Prevolence of per and V B beta-lactamase genes among Acinetobacter bumanni isolates frompatients in Tehran by PCR. Iran J Med Microbiol 2014;8:28-35.

28. Ahadi A, Sharif Zadeh A, Golshani Z. Identification of antibiotic resistance patterns of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients admitted with multiple resistance. J Veterinary Lab Res 2012;4:119-22.