

بررسی ارتباط میان حضور ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی کد کننده آنزیم AmpC و نوع نمونه بالینی در سودوموناس آئروژینوزا

حامد طهماسبی^۱(MSc)، محمد یوسف علیخانی^۲(PhD)، ساناز ده باشی^۳(MSc)، محمدرضا عربستانی^۴(PhD)

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳- مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

دریافت: ۹۶/۶/۲۵، اصلاح: ۹۶/۹/۲۶، پذیرش: ۹۶/۱۰/۳

خلاصه

سابقه و هدف: نمونه‌های بالینی مختلف نقش تعیین کننده‌ای در نوع و نحوه مقاومت ارگانیسم‌های بیماری‌زا در برابر درمان دارند. گاهی، حضور برخی ژن‌های عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی با نوع نمونه بالینی ارتباط دارد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط میان حضور ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی کد کننده AmpC و نوع نمونه بالینی در سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-تجربی ۱۱۴ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، نمونه‌های بالینی شامل خون، ادرار، ترشحات زخم، زخم بیماران سوختگی از بیمارستان‌های آموزشی شهر همدان جمع آوری گردید. حضور ژن‌های AmpC پلاسمیدی و کروموزومی با استفاده از تکنیک Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ژن‌های AmpC پلاسمیدی نسبت به ژن‌های کروموزومی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا بیشتر مشاهده شد. در ژن‌های AmpC پلاسمیدی ژن FOX با تعداد ۲۹ (۳۷/۶۶٪) $p \leq 0.037$ و DHA و با تعداد ۵ (۶/۴٪) $p \leq 0.015$ و در ژن‌های AmpC کروموزومی FOX با تعداد ۳۹ (۴۸/۷۵٪) $p \leq 0.001$ و MOX با تعداد ۲ (۷/۳۶٪) $p \leq 0.015$ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که حضور ژن‌های کروموزومی-پلاسمیدی کدکننده آنزیم AmpC با توجه به نوع نمونه بالینی می‌تواند دارای فراوانی متفاوت باشد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت دارویی، بتالاکتامازهای گروه آمیلر، پلاسمید، کروموزوم.

مقدمه

هر عامل بیماری‌زا که وارد بدن انسان می‌شود، برای ایجاد بیماری‌زایی باید در بافت هدف خود مستقر شود. باکتری‌های بیماری‌زا نیز از این امر مستثنی نمی‌باشند و هر کدام می‌توانند با توجه به بافت درگیر کننده و مقیم خود، میزان آسیب و عفونت‌زایی متفاوتی داشته باشند (۱ و ۲). جهت درمان عفونت‌های باکتریایی، با توجه به میزان عفونت و عضو درگیر، همیشه مقادیر مصرف آنتی‌بیوتیک و دز مصرفی آن متفاوت است (۳). از این رو، نمونه‌های بالینی مختلف همیشه نقش تعیین کننده‌ای در نوع و نحوه مقاومت ارگانیسم‌های بیماری‌زا در برابر درمان داشته‌اند (۱). در بسیاری از بیماری‌های باکتریایی، میزان داروی تجویزی با توجه به بافت هدف تعیین می‌گردد و این امر سبب می‌شود در محل‌های باز که دسترسی سریع تری به منشاء عفونت می‌باشد، درمان با کمترین مقدار دز دارویی انجام شود (۲). باکتری‌هایی که از نظر حضور در فضاهای عمومی و بیمارستانی شیوع بیشتری دارند و به نوعی در گروه باکتری‌های بیمارستانی جای می‌گیرند، حصول این امر را راحت می‌کنند. سودوموناس آئروژینوزا یکی از این باکتری‌ها می‌باشد که توانایی مقیم شدن در مکان‌های مختلفی از بدن انسان را دارد (۴). سودوموناس آئروژینوزا مهم‌ترین پاتوژن انسانی و دومین عامل

عفونت‌های سوختگی است، همچنین این باکتری در محیط‌های بیمارستانی و در مناطق مرطوب یافت می‌شود (۵ و ۶). وجود سوبه‌های با مقاومت چندگانه دارویی در این باکتری مشکل اصلی در درمان باکتری در بخش‌های مهم بیمارستانی مانند سوختگی و مراقبت‌های ویژه است (۷). بتالاکتامازها یک گروه نامتجانس از آنزیم‌های باکتریایی می‌باشند (۲) که براساس معیارهای مختلفی همچون طیف هیدرولیزی آنزیم، میزان حساسیت در برابر مهار کننده‌های بتالاکتاماز، مکان ژنتیکی آنزیم (پلاسمیدی، کروموزومی، اینترگرونی) و توالی آمینواسیدی پروتئین طبقه‌بندی می‌شوند (۸). برای طبقه‌بندی بتالاکتامازها روش‌های متعددی وجود دارد که در بین آنها طبقه‌بندی آمیلر و طبقه‌بندی بوش کاربرد بیشتری پیدا کرده‌اند. بر اساس دسته‌بندی آمیلر، بتالاکتامازهای گروه C که به AmpC نیز شهرت دارند، یکی از مهمترین عوامل مقاومتی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی می‌باشد (۸). بتالاکتامازهای نوع AmpC در اواخر دهه ۱۹۷۰ ظاهر و مورد مطالعه قرار گرفتند. این آنزیم‌ها سفاکسپورین‌های وسیع‌الطیف مانند سفنازیدیم، سفتریاکسون، سفپیم و مونوباکتام‌هایی مانند آزترونام و سفامیسین‌ها را هیدرولیز می‌نمایند. اما توسط مهار کننده‌های معمولی مانند کلاولانات

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۵۱۰۰۷۵۷۵۵ دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمدرضا عربستانی

آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۸۱-۲۳۸۳۸۰۷۷

E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

شده بر روی محیط Cetremide Agar (Merck آلمان) کشت داده شد و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در نهایت با استفاده از تست های مختلف بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز، ایندول، متیل رد و کشت بر روی محیط های شناساگر) ایزوله های بدست آمده تعیین جنس و گونه شدند (۱۳).

تعیین فنوتیپی سویه های مولد AmpC به روش دیسک دیفیوژن: برای بررسی وجود AmpC از دیسک های سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و سفیدوکسیم (۱۰ میکروگرم) (Mast انگلستان) به همراه ترکیبات مهار کننده آنزیم AmpC استفاده شد. در کلیه موارد از کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 به عنوان نمونه کنترل مثبت و از سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۱۴).

استخراج DNA و پلاسمید باکتریایی: استخراج پلاسمید و DNA با استفاده از کیت استخراج صورت گرفت. بعد از کشت ایزوله ها بر روی محیط Mueller-Hinton agar (Merck آلمان) کشت داده شد. سپس چند کلنی از هر ایزوله کشت داده شده به ۵ میلی لیتر محیط کشت LB Broth (sigma aldrich) کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵±۲ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سایر مراحل استخراج DNA و پلاسمید با استفاده از کیت استخراج سینا ژن ایران انجام شد.

آماده سازی پرایمرها و انجام آزمون PCR: برای انجام واکنش PCR برای هر نمونه ۲۵ میکرولیتر از مستر میکس قرمز (شرکت Ampliqon آلمان) با ۱ لاند از DNA استخراج شده و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر میکس اولیه آماده شد (جدول ۱) و برای رساندن حجم نهایی به ۵۰ میکرولیتر به آن آب مقطر اضافه گردید. برای تکثیر ژن های مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا) با تنظیمات سیکل دمایی بصورت شوک حرارتی ۹۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و تعداد ۳۵ سیکل بصورت ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، دمای انلینگ ۶۱ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه اعمال شد. طولیل شدن نهایی هم در ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در نهایت محصولات بدست آمده جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

مهار نمی شوند (۹). آنزیم AmpC که اغلب توسط بتالاکتامها قابل القاء می باشند به وسیله ژن های کروموزومی کد می شوند. آنزیم AmpC با واسطه پلاسمید میتواند به ارگانیزم های فاقد این آنزیم منتقل شده و مقاومتی شبیه به مقاومت بتالاکتامی را سبب شود (۹).

در یک بررسی انجام شده توسط Chiquet و همکاران مشخص شد که بین حضور برخی باکتری های عامل کراتیت چشمی و مقاومت به برخی آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، ارتباط مستقیمی وجود دارد (۱۰). همچنین Jansen و همکاران با مطالعه بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا نشان دادند که بین ایزوله های جدا شده از نمونه های سیستمیک فیبروزیس و سایر نمونه های بالینی، از نظر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی تفاوت قابل ملاحظه ای وجود دارد (۱۱). با این حال، این احتمال وجود دارد که بین نمونه های مختلف بالینی که سویه های سودوموناس آئروژینوزا از آن جدا شده است و میزان و نوع مقاومت آنتی بیوتیکی ارتباطی وجود داشته باشد (۱۲).

ممکن است این امر تا حدی پیش روی کند که سبب ظهور سویه های متفاوت در یک شخص که توسط یک گونه مشترک از باکتری آلوده شده است، را سبب شود. لذا هدف از این مطالعه بررسی ارتباط میان حضور ژن های کروموزومی و پلاسمیدی کدکننده آنزیم AmpC و نوع نمونه بالینی در سودوموناس آئروژینوزا می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری، شناسایی و ایزوله کردن سودوموناس آئروژینوزا: در این مطالعه توصیفی- تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد اخلاقی IR.UMSHA.REC. ۱۳۹۵.۴۰۲ به روش نمونه گیری آسان، تصادفی و در دسترس، ۱۱۴ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا طی یک دوره ۹ ماهه از تیر ۹۵ تا فروردین ۹۶ از مجموع ۲۸۸ نمونه بالینی مختلف جداسازی شد. نمونه ها با منشا باکتریایی وارد مطالعه شدند. جهت غربالگری اولیه، نمونه های جمع آوری

جدول ۱. لیست پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن های کروموزومی و پلاسمیدی سویه های سودوموناس آئروژینوزا مولد AmpC

ژن	نام پرایمر	توالی نوکلئوتید ها	طول آمپلیکون (جفت باز)	منبع
MOX	MOXMF MOXMR	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC	۵۲۰	(۱۵)
CIT	CITMF CITMR	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTG AACGTGGCTGGC	۴۶۲	(۱۵)
DHA	DHAMF DHAMR	AACTTTACAGGTGTGCTGGGT CCGTACGCATACTGGCTTTGC	۴۰۵	(۱۵)
EBC	EBCMF EBCMR	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	۳۰۲	(۱۵)
FOX	FOXMF FOXMR	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	۱۹۰	(۱۵)
ACC	ACCMF ACCMR	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	۳۴۶	(۱۵)
AmpC1	PreAmpC-PA1 PostAmpC-PA2	ATGCAGCCAACGACAAAGG CGCCCTCGCGAGCGCGCTTC	۱۲۴۳	(۱۵)
AmpC2	AmpC-PA-A AmpC-PA-B	CTTCCACACTGCTGTTTCGCC TTGGCCAGGATCACCAGTCC	۱۰۶۳	(۱۵)

پلاسمیدی، ۱۲ ایزوله (۱۰/۵۲٪) از خون، ۲۳ ایزوله (۲۸/۷۵٪) از ادرار، ۸ ایزوله (۱۰٪) از ترشحات زخم، ۲۷ ایزوله (۳۳/۷۵٪) از زخم بیماران سوختگی، ۲ ایزوله (۲/۲۵٪) از کاتتر و ۵ ایزوله (۶/۲۵٪) از مایع مغزی نخاعی بدست آمد. بیشترین سویه های AmpC کروموزومی و پلاسمیدی نیز از بیماران بخش های ICU و اطفال جداسازی شده بودند.

از نظر نوع نمونه بالینی، بیشترین سویه های AmpC مثبت، از نمونه های ادرار و کشت بدست آمدند و کمترین آن مربوط به نمونه های گرفته شده از ترشحات زخم بود. این مقادیر شامل هر دو گروه پلاسمیدی و کروموزومی بود. علاوه بر این، با توجه به نمونه های بدست آمده بیشترین سویه های سودوموناس آئروژینوزا مولد آنزیم AmpC کروموزومی و پلاسمیدی از بیماران زن جداسازی شد. از ۸۰ ایزوله حاوی ژن های AmpC کروموزومی، ۵۹ ایزوله (۷۳/۷۵٪) از بیماران زن و ۲۱ ایزوله (۲۵/۲۶٪) از بیماران مرد جداسازی شد ارتباط معنی داری بین حضور ژن های AmpC کروموزومی و نمونه های بالینی مختلف مشاهده شد (جدول ۲). همچنین از ۷۷ ایزوله بالینی دارای ژن ApmC پلاسمیدی، ۴۱ ایزوله (۵۲/۲۴٪) از مردان و ۳۶ ایزوله (۴۶/۵۳٪) از زنان بدست آمد و ارتباط معنی داری بین حضور ژن های AmpC پلاسمیدی و نمونه های بالینی مختلف مشاهده شد (جدول ۳).

آنالیز داده ها: نتایج بدست آمده از تعیین مقاومت های آنتی بیوتیکی به روش فنوتیپی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری χ^2 تجزیه و تحلیل شدند و $p \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

پراکنش ایزوله های حامل آنزیم AmpC: در این مطالعه بعد از انجام تست های فنوتیپی و غربالگری اولیه، از ۱۱۴ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی، ۹۷ ایزوله (۸۵/۰۸٪) به روش فنوتیپی دارای آنزیم AmpC در نظر گرفته شدند. از مجموع ۹۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا حامل آنزیم AmpC، ۸۰ ایزوله (۸۲/۴۲٪) حامل ژن های کروموزومی و ۱۷ ایزوله (۷۹/۳۸٪) حامل ژن های پلاسمیدی بودند.

پراکنش نمونه های بالینی در ایزوله های حاوی ژن های AmpC: در این مطالعه، از مجموع ۸۰ ایزوله حامل آنزیم AmpC کروموزومی، ۲۲ ایزوله (۲۷/۵٪) از خون، ۱۰ ایزوله (۱۲/۵٪) از ادرار، ۱۶ ایزوله (۲۰٪) از ترشحات زخم، ۱۹ ایزوله (۲۳/۷۵٪) از زخم بیماران سوختگی، ۹ ایزوله (۱۱/۲۵٪) از کاتتر و ۴ ایزوله (۵٪) از مایع مغزی نخاعی بدست آمد. همچنین از ۷۷ سویه حامل آنزیم های AmpC

جدول ۲. فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد AmpC کروموزومی بر اساس تست های ژنوتیپی در نمونه های بالینی

بخش جدا شده	کشت ادرار	ترشحات زخم	کشت خون	زخم بیماران سوختگی	کشت از آلودگی کاتتر	کشت مایع مغزی-نخاعی	جمع کل	P-value
CIT	۰	۰	۵	۳	۰	۰	۸	≤ 0.004
DHA	۳	۱	۰	۰	۰	۰	۴	≤ 0.001
EBC	۰	۲	۳	۸	۱	۲	۱۶	≤ 0.009
FOX	۶	۱۰	۱۳	۸	۲	۰	۳۹	≤ 0.001
ACC	۱	۳	۰	۰	۳	۲	۹	≤ 0.018
MOX	۰	۰	۱	۰	۲	۰	۲	≤ 0.015

جدول ۳. فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد AmpC پلاسمیدی بر اساس تست های ژنوتیپی در نمونه های بالینی

بخش جدا شده	کشت ادرار	ترشحات زخم	کشت خون	زخم بیماران سوختگی	کشت از آلودگی کاتتر	کشت مایع مغزی-نخاعی	جمع کل	P-value
CIT	۲	۱	۱	۴	۰	۰	۸	≤ 0.005
DHA	۳	۱	۰	۱	۰	۰	۵	≤ 0.015
EBC	۰	۲	۴	۴	۰	۰	۱۰	≤ 0.007
FOX	۱۴	۱	۶	۸	۰	۰	۲۹	≤ 0.037
ACC	۱	۳	۰	۶	۰	۱	۱۱	≤ 0.023
MOX	۳	۰	۱	۵	۲	۰	۱۴	≤ 0.041

پلاسمیدی ACC، ۵ ایزوله (۶/۴٪) دارای ژن پلاسمیدی DHA، ۸ ایزوله (۱۰/۳۸٪) دارای ژن پلاسمیدی CIT و ۱۴ ایزوله (۱۸/۱۸٪) از ایزوله ها دارای ژن پلاسمیدی Mox بودند. همچنین از مجموع ۸۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا حامل AmpC کروموزومی ۳۹ ایزوله (۴۸/۷۵٪) دارای ژن کروموزومی Fox، ۱۶ ایزوله (۲۰٪) دارای ژن کروموزومی EBC، ۹ ایزوله (۲۳/۵۷٪) دارای ژن

فراوانی خانواده های ژنی AmpC پلاسمیدی و کروموزومی: ژن های AmpC پلاسمیدی نسبت به ژن های کروموزومی در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بیشتر مشاهده شد. از مجموع ۷۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا حامل AmpC پلاسمیدی ۲۹ ایزوله (۳۷/۶۶٪) دارای ژن پلاسمیدی Fox، ۱۰ ایزوله (۱۲/۹۵٪) دارای ژن پلاسمیدی EBC، ۱۱ ایزوله (۱۴/۸۲٪) دارای ژن

می‌تواند اعضای مختلفی را دچار عفونت کند. در برخی موارد ممکن است حضور و فعالیت باکتری در بخش‌های مختلف، نوع و دامنه مقاومت آن را نیز تحت تاثیر قرار دهد (۱۸و۱۷). همچنین مطالعه Garrec و همکاران نیز نشان داد که روش‌های فنوتیپی در بیشتر مواقع با خطا در تشخیص و گزارشات همراه می‌باشند (۱۹)، که علت این امر می‌تواند به دلیل تجربه شخص آزمایشگر، کیفیت مواد مورد استفاده جهت انجام آزمون، شرایط محیطی انجام آزمون از قبیل شرایط دمایی و pH، شرایط انکوباسیون نمونه‌ها و همچنین تجهیزات مورد استفاده جهت آزمایش باشد که تمام موارد ذکر شده بر روی نتایج حاصل از روش‌های فنوتیپی تاثیرگذار می‌باشند. سودوموناس آئروژینوزا مقاومت زیادی نسبت به بسیاری از مواد ضد میکروبی و ضد عفونی کننده نظیر ترکیبات آمونیوم، هگزا کلروفن، صابون‌ها و محلول‌های ید دارد (۱۸).

از این رو باید این انتظار را داشت که ایزوله‌های جمع آوری شده از قسمت‌هایی از بدن که بیشتر در برابر عوامل ضد عفونی کننده مانند بتادین، الکل و مواد دیگر می‌باشند، در برابر درمان از خود مقاومت بیشتری نشان دهند (۲۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نمونه‌های بدست آمده از زخم‌های سوختگی و ترشحات دارای بیشترین میزان پراکنش ژنی بودند. همچنین عفونت‌های ناشی از کاتتر و عفونت‌های ادراری نیز دارای پراکنش قابل ملاحظه‌ای از نظر ژن‌های *AmpC* بودند. در مطالعه‌ای که Cornut و همکاران داشتند مشخص شد که نمونه‌هایی که از عفونت‌های ایجاد شده از سطوح باز گرفته شده است، نسبت به سایر نمونه‌های حامل عفونت باکتریایی، دارای مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک و درمان می‌باشد (۲۱). سودوموناس آئروژینوزا مسئول ۱۱ تا ۱۳ درصد از عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بیماران فیبروز سیستیک، اشخاص دچار سوختگی یا دارای نقص ایمنی و افرادی که از دستگاه‌های ونتیلیتور استفاده می‌کنند، می‌باشد. سپسس ناشی از این باکتری یک عارضه جدی متعاقب عفونت سوختگی است (۲۲و۲۳).

این امر با نتایجی که از نمونه‌های حاصل از سوختگی و ترشحات زخمی بدست آمد، همخوانی داشت، بطوریکه بیشتر نمونه‌های دارای خانواده‌های ژنی *AmpC* پلاسمیدی و کروموزومی در گروه عفونت‌های ساکن در زخم‌ها بدست آمد. البته در بروز مقاومت‌های وابسته به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی که به واسطه پلاسمید منتقل می‌شوند کاهش نفوذپذیری ارگانیسم به دارو که تغییر در گیرنده اختصاصی و تمایل دارو و تغییر جزئی در یک یا چند جز از پوشش سلولی و از دست دادن ظرفیت انتقال فعال برای دارو از غشا سلولی را در پی دارد را نباید نادیده گرفت (۲۳و۲۴).

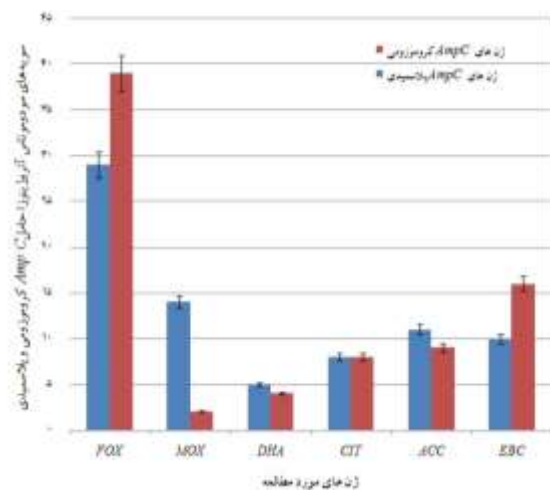
این درحالی است که، هر چه عوامل مداخله‌ای در محیط زندگی باکتری کمتر باشد، ارگانیسم راحت‌تر می‌تواند الگوی مقاومتی خود را تنظیم کند (۲۵). در مطالعه حاضر، ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای *AmpC* پلاسمیدی جدا شده از نمونه خون دارای فراوانی کمتری نسبت به ایزوله‌های دارای ژن‌های کروموزومی بود. از جمله اختلافاتی که در بررسی‌های نمونه‌های بالینی صورت گرفت، می‌توان به عدم همخوانی حضور ژن‌های پلاسمیدی و کروموزومی در باکتری‌های بدست آمده اشاره کرد. در مطالعه Rafiee و همکاران بر روی طیف گسترده باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی داشتند، مشخص شد که بین نوع نمونه بالینی و پراکنش ژن‌های پلاسمیدی و کروموزومی نیز می‌تواند ارتباطی وجود داشته باشد. در این پژوهش ۲۵ ساله، حضور فعال باکتری‌های

کروموزومی *ACC*، ۴ ایزوله (۲۷/۵٪) دارای ژن کروموزومی *DHA*، ۸ ایزوله (۴/۲۱٪) دارای ژن کروموزومی *CIT* و ۲ ایزوله (۷/۳۶٪) از ایزوله‌های دارای ژن کروموزومی *Mox* بودند. بیشترین نمونه‌هایی که دارای ژن *Fox* بودند از بیماران بستری در بخش ICU و اطفال بدست آمد (نمودار ۱ و شکل ۱). ارتباط معنی داری بین نوع نمونه بالینی و پراکنش ژن‌های عامل مقاومت به بتالاکتامازهای گروه C آمپر وجود نداشت.



شکل ۱. نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های گروه *AmpC*.

ژن *MOX* با طول ۵۲۰ جفت باز، ژن *CIT* با طول ۴۶۲ جفت باز، ژن *DHA* با طول ۴۰۵ جفت باز، ژن *EBC* با طول جفت ۳۰۲، ژن *FOX* با طول ۱۹۰ جفت باز و ژن *ACC* با طول ۳۳۶ جفت باز. چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن‌ها. چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی



نمودار ۱. فراوانی خانواده ژنی *AmpC* کروموزومی و پلاسمیدی

بحث و نتیجه گیری

در این بررسی از ۱۱۴ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی شده، ۹۷ ایزوله با استفاده از روش‌های فنوتیپی مولد آنزیم *AmpC* تشخیص داده شدند. این در حالی بود که، نتیجه حاصل با نتایج بدست آمده از روش‌های مولکولی تفاوت داشت. در مطالعاتی که Lin و همکاران داشتند مشخص شد که روش‌های فنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های حامل *AmpC* دارای حساسیت قابل قبولی نیستند (۱۶). باکتری سودوموناس آئروژینوزا با توجه به ویژگی‌های خاص خود

بیمارستانی و انتقال ژن ها در نمونه های بالینی مختلف مورد بررسی قرار گرفت (۲۲). نتایج بدست آمده از این مطالعه مشخص کرد که حضور ژن های کروموزومی-پلاسمیدی کدکننده آنزیم *AmpC* می تواند با توجه به نوع نمونه بالینی دارای فراوانی متفاوت باشد. پراکنش سویه های سودوموناس آئروژینوزای حامل ژن های پلاسمیدی و کروموزومی در نمونه های بالینی مختلف نشان داد که حتی منبع عفونت و بافت درگیر شده توسط باکتری نیز می تواند الگوی ژنی اورگانیزم را تحت تاثیر قرار دهد. از این رو، برخی ایزوله ها نسبت به درمان و خطوط آنتی بیوتیکی مصرفی از خود مقاومت نشان داده و مسیر درمان را تغییر می دهند. از این رو، با شناسایی این ارتباطات می توان مسیر درمان عفونت های

وابسته به سودوموناس آئروژینوزا را کنترل کرد. از طرفی، با توجه به مقطعی بودن مطالعه و محدودیت های حاکم بر آن، در سطوح گسترده و با کاهش دامنه احتمالات، قابل استفاده نمی باشد، از این رو انجام مطالعات بیشتر پیشنهاد می شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان و پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه تشکر و قدردانی می گردد.

Investigation of the Relationship between the Presence of Chromosomal and Plasmid-Encoded AmpC Genes and Type of Clinical Specimen in *Pseudomonas Aeruginosa*

H. Tahmasebi (MSc)¹, M. Yousef Alikhani (PhD)², S. Dehbashi(MSc)², M.R. Arabestani (PhD)^{*3}

1.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R.Iran.

2.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.

3.Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 20(3); Mar 2018; PP: 36-43

Received: Sep 16th 2017, Revised: Dec 17th 2017, Accepted: Dec 24th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Different clinical specimens play a decisive role in the type and nature of drug resistance in pathogenic organisms. Occasionally, the presence of certain antibiotic resistance genes is associated with the type of clinical specimen. The aim of this study was to determine the relationship between the presence of chromosomal and plasmid-encoded AmpC genes and type of clinical specimen in *Pseudomonas aeruginosa*.

METHODS: In this descriptive and experimental study, 114 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, and clinical specimens including blood, urine, wound secretion, burn injuries were collected from teaching hospitals in Hamadan. The presence of chromosomal and plasmid-encoded AmpC genes was evaluated using multiplex PCR technique.

FINDINGS: The plasmid-encoded AmpC genes were observed more than chromosomal genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The FOX gene with a value of 29 (37.66%) ($p \leq 0.037$) and DHA gene with a value of 5 (6.4%) ($p \leq 0.015$) in plasmid-encoded AmpC genes, while FOX gene with a value of 39 (48.75%) ($p \leq 0.001$) and MOX gene with a value of 2 (7.36%) in chromosomal AmpC genes had the highest and lowest frequency, respectively.

CONCLUSION: The results of the study showed that the presence of chromosomal and plasmid-encoded AmpC genes may have various frequencies according to the type of clinical specimen.

KEYWORDS: *Pseudomonas Aeruginosa*, Drug Resistance, Ambler Classification of *B-Lactamases*, Plasmid, Chromosome.

Please cite this article as follows:

Tahmasebi H, Yousef Alikhani M, Dehbashi S, Arabestani MR. Investigation of the Relationship between the Presence of Chromosomal and Plasmid-Encoded AmpC Genes and Type of Clinical Specimen in *Pseudomonas Aeruginosa*. J Babol Univ Med Sci. 2018; 20(3):36-43.

***Corresponding Author; M.R. Arabestani (PhD)**

Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.

Tel: +98 81 23838077

E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com.

References

1. Tuuminen T, Osterblad M, Hamalainen S, Sironen R. Relapsing sepsis episodes of *Escherichia coli* with CTX-M ESBL or derepressed AmpC genes in a patient with chronic autoimmune pancreatitis complicated by IgG4 hypergammaglobulinaemia. *New Microbes New Infect.* 2016;9:50-3.
2. Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi Mashouf R, Alikhani MY, Mousavi SM. Correlation Between the Expression of oprd gene and sensitivity to carbapenems of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qrt-pcr. *Arak Med Univ J.* 2015;17(11):70-9. [In Persian].
3. Rezaei F, Sadari H, Boroumandi S, Faghihzadeh S. Relation between resistance to antipseudomonal beta-lactams and ampc and mexc genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Pathol.* 2016;11(1):47-53.
4. Bokaeian M, Tahmasebi H. Molecular Identification of Genes Responsible for Resistance to Aminoglycosides and Methicillin in Clinical Samples of *Staphylococcus Aureus*. *J Babol Univ Med Sci.* 2017;19(3):38-46. [In Persian].
5. Rajabpour M, Arabestani mR, Yousefi mashof R, 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 Med Microbiol.* 2013;7(3):18-25. [In Persian].
6. Salehi Z, Amini K, Kheirkhah B. Molecular identification of quorum sensing genes in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance profile. *J Babol Univ Med Sci.* 2017;19(4):46-53. [In Persian].
7. Ahmadi Roudbaraki Z, Ranji N, Soltani Tehrani B. Deregulation of mexb gene in ciprofloxacin resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* treated with silibinin-encapsulated in nanoparticles . *J Babol Univ Med Sci.* 2017;19(11):42-9. [In Persian]
8. Bogaerts P, Huang TD, Bouchahrouf W, Bauraing C, Berhin C, El Garch F, et al. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing Enterobacteriaceae from Diseased Companion Animals in Europe. *Microb Drug Resist.* 2015;21(6):643-50.
9. Bermudes H, Arpin C, Jude F, El-Harrif Z, Bébér 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(7):523-9.
10. Chiquet C, Maurin M, Altayrac J, Aptel F, Boisset S, Vandenesch F, et al. Correlation between clinical data and antibiotic resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from 68 patients with acute post-cataract endophthalmitis. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(6):592.
11. Jansen G, Mahrt N, Tueffers L, Barbosa C, Harjes M, Adolph G, et al. Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of *Pseudomonas* in the cystic fibrosis lung. *Evol Med Public Health.* 2016;2016(1): 182-94.
12. Marsik FJ, Nambiar S. Review of Carbapenemases and AmpC-beta Lactamases. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(12):1094-5.
13. 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. [In Persian].
14. CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015.
15. 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 cmv-2-type ampc β -lactamase resistance in china. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1317-21.
16. Lin S-P, Liu M-F, Lin C-F, Shi Z-Y. Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum β -lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Microbiol, Immunol Infect.* 2012;45(3):200-7.
17. 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. [In Persian].

18. Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated ampc beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals. *Biomed Res Int*. 2014;2014:171548
19. Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard J-L, Jarlier V, Robert J. Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase Production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microb*. 2011;49(3):1048-57.
20. Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, de Souza JMA, et al. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. *Antimicrob Agent Chemother*. 2006;50(1):388-90.
21. Cornut PL, Thuret G, Creuzot-Garcher C, Maurin M, Pechinot A, Bron A, et al. Relationship between baseline clinical data and microbiologic spectrum in 100 patients with acute postcataract endophthalmitis. *Retina*. 2012;32(3):549-57.
22. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*. 2000;2(9):1051-60.
23. Fisher JF, Mobashery S. 8.13 - Enzymology of Bacterial Resistance. In: Liu H-W, Mander L, editors. *Comprehensive Natural Products II*. Oxford: Elsevier; 2010. p. 443-87.
24. Gentile RC, Shukla S, Shah M, Ritterband DC, Engelbert M, Davis A, et al. Microbiological spectrum and antibiotic sensitivity in endophthalmitis. *Ophthalmol*. 2014;121(8):1634-42.
25. Rafiee R, Eftekhari F, Tabatabaei SA, Minaee Tehrani D. Prevalence of extended-spectrum and metallo β -lactamase production in ampc β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(9):16436.